

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

EPO/107255



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 103 33 479.3

Anmeldetag: 22. Juli 2003

Anmelder/Inhaber: SunGene GmbH & Co KGaA, 06466 Gatersleben/DE

Bezeichnung: Expressionskassetten zur bidirektionalen transgenen Expression von Nukleinsäuren in Pflanzen

IPC: C 12 N 15/82

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 11. Mai 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Höß

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

Expressionskassetten zur bidirektionalen transgenen Expression von Nukleinsäuren in Pflanzen

Beschreibung

5 Die Erfindung betrifft Expressionskassetten und Vektoren, die pflanzliche bidirektionale Promotoren enthalten, sowie die Verwendung dieser Expressionskassetten oder Vektoren zur transgenen Expression von Nukleinsäuresequenzen in pflanzlichen Organismen. Die Erfindung betrifft ferner mit diesen Expressionskassetten oder Vektoren transformierte transgene pflanzliche Organismen, davon abgeleitete Kulturen, Teile oder Vermehrungsgut, sowie die Verwendung derselben zur Herstellung von Nahrungs-, Futtermitteln, Saatgut, Pharmazeutika oder Feinchemikalien.

10

15 Die Herstellung transgener Pflanzen ist eine grundlegende Technik der Pflanzenbiotechnologie und damit eine unerlässliche Voraussetzung für die pflanzliche Grundlagenforschung, sowie für die Herstellung von Pflanzen mit verbesserten, neuen Eigenschaften für die Landwirtschaft, zur Qualitätssteigerung bei Nahrungsmitteln oder zur Produktion bestimmter Chemikalien oder Pharmazeutika. Eine Grundvoraussetzung für die transgene Expression bestimmter Gene in Pflanzen ist die Bereitstellung pflanzenspezifischer Promotoren. Verschiedene pflanzliche Promotoren sind bekannt. Die derzeit in Pflanzen überwiegend verwendeten konstitutiven Promotoren sind fast ausschließlich virale oder aus *Agrobacterium* isolierte Promotoren wie beispielsweise der CaMV35S Promotor aus dem Blumenkohl-Mosaikvirus (Odell et al. (1985) *Nature* 313:810-812). Die zunehmende Komplexität pflanzenbiotechnologischer

20 Arbeiten erfordert oft die Transformation mit mehreren Expressionskonstrukten. Die mehrfache Verwendung ein und desselben Promotors ist insbesondere bei Pflanzen problematisch, da das mehrfache Vorliegen gleicher regulatorischer Sequenzen eine Abschaltung der Genaktivität („Silencing“) bewirken kann (Kumpatla et al. (1998) *TIBS* 3:97-104; Selker (1999) *Cell* 97:157-160). Es besteht daher ein zunehmender Bedarf an neuen Promotoren. Ein alternativer Umgang mit diesem Problem ist die Verwendung von sogenannten „bidirektionalen“ Promotoren d.h. regulatorischen Sequenzen, die in beide Richtung eine Transkription der vor- bzw. nachgeschalteten DNA Sequenzen bewirken. Hier können beispielsweise Zielgen und Markergen unter der Kontrolle einer DNA-Sequenz in eine Zelle eingebracht werden.

25

30

35 Die transgene Expression unter Kontrolle bidirektionaler Promotoren ist bislang kaum beschrieben. Beschrieben ist die Herstellung von bidirektionalen Promotoren aus polaren Promotoren für die Expression von Nukleinsäuren in Pflanzen mittels Fusion mit weiteren transkriptionellen Elementen (Xie M (2001) *Nature Biotech* 19: 677-679). Der 35S Promoter wurde ebenfalls in einen bidirektionalen Promoter umgewandelt (Dong JZ et al. (1991) *BIO/TECHNOLOGY* 9: 858-863). WO 02/64804 beschreibt die Konstruktion eines bidirektionalen Promotor Komplexes basierend auf der Fusion von Enhancer- und Kernpromotorelementen verschiedener viral (CaMV 35S, CsVMV) und pflanzlicher (Act2, PRb1b) Sequenzen. US20020108142 beschreibt eine regulatorische Sequenz aus einem Intron des Phosphatidylinositol Transfer-like Protein IV aus *Lotus japonicus* (PLP-IV; GenBank Acc.-No.: AF367434) und deren Verwendung als bidirektionaler Promoter. Dieses Intronfragment hat nur in der Infektionszone der Knöllchen eine transkriptionelle Aktivität. Andere Gewebe, Wurzeln, Blätter oder Blüten zeigen keine Färbung.

40

45

Pflanzliche Promotoren, die eine bidirektionale, ubiquitäre (d.h. im wesentlichen gewebe-unspezifische) und konstitutive Expression in Pflanzen erlauben, sind bislang nicht offenbart.

5 WO 03/006660 beschreibt einen Promotor eines putativen Ferredoxin Gens sowie Expressionskonstrukte, Vektoren und transgene Pflanzen, die diesen beinhalten. Die isolierten 836 bp 5'-flankierende Sequenz fusioniert mit dem Gen der Glucuronidase zeigen in transgenem Tabak überraschenderweise ein konstitutives Expressionsmuster. Die Sequenz entspricht einem Sequenzabschnitt auf Chromosom 4 von *Arabidopsis thaliana* wie er in der GenBank unter der Acc.-No. Z97337 hinterlegt ist (Version Z97337.2; Basenpaar 85117 bis 85952; das Gen beginnend ab bp 85953 ist mit "strong similarity to ferredoxin [2Fe-2S] I, *Nostoc muscorum*" annotiert). In den Antheren/Pollen der geschlossenen Blütenknospen konnte nur eine schwache Aktivität, 10 in reifen Blüten gar keine mehr detektiert werden. Entgegen den aus den Literaturbefunden abgeleiteten Vorbehalten gegen eine Eignung des Promotors zur effektiven Expression von Selektionsmarkern (zum Beispiel aufgrund der vermuteten Blattspezifität oder der Funktion im photosynthetischen Elektronentransport), konnte eine 15 hocheffiziente Selektion durch Kombination mit beispielsweise dem Kanamycin-Resistenzgen (*nptII*) demonstriert werden. In WO 03/006660 ist lediglich die Verwendung als „normaler“ konstitutiver Promotor beschrieben. Eine Verwendung als 20 bidirektionaler Promotor ist nicht offenbart.

25 Um über einen Transferkomplex möglichst viele Gene in ein Pflanzengenom zu integrieren, ist es notwendig, die Anzahl und Größe regulatorischer Sequenzen für die Expression transgener Nukleinsäuren zu begrenzen. Bidirektional wirkende Promotoren tragen zur Lösung dieser Aufgabe bei. Von besonderen Vorteil ist die Verwendung eines bidirektionalen Promoters, wenn dessen Aktivitäten koordiniert in gleicher Stärke vorhanden sind und auf einem kurzen DNA Fragment liegen. Da die Verwendung 30 viraler Sequenzen für die Expression in transgenen Pflanzen wenig Akzeptanz findet, ist es von Vorteil regulatorische Sequenzen ebenfalls aus Pflanzen zu nutzen.

35 Die der vorliegenden Erfindung zugrunde liegende Aufgabe bestand in der Bereitstellung von transgenen Expressionskassetten umfassend pflanzliche regulatorische Sequenzen, die eine bidirektionale, ubiquitäre und entwicklungsunabhängige (konstitutive) Expression zweier transgen zu exprimierender Nukleinsäuresequenzen vermitteln.

40 Diese Aufgabe wird durch die vorliegende Erfindung gelöst. Ein erster Gegenstand der Erfindung betrifft daher Expressionskassetten zur transgenen Expression von zwei Nukleinsäuresequenzen in einer pflanzlichen Zelle umfassend mindestens eine regulatorische Sequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus.

45 a) dem Promotor gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2,
b) funktionellen Äquivalenten des Promotor gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2, die eine Identität von mindestens 80% zu der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2 aufweisen und die im wesentlichen die gleiche Promotoraktivität wie der Promotor gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2 besitzen,

5 b) funktionellen Äquivalenten des Promotor gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2 welche mindestens 25 aufeinanderfolgende Nukleotide der Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2 umfassen und die im wesentlichen die gleiche Promotoraktivität wie der Promotor gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2 besitzen, und

10 c) funktionell äquivalente Fragmente der Sequenzen a) oder b) oder c), die mindestens 25 aufeinanderfolgende Nukleotide besagter Sequenzen a) oder b) oder c) aufweisen und im wesentlichen die gleiche Promotoraktivität wie der Promotor gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2 besitzen,

15 10 wobei besagtes regulatorisches Element zwischen zwei Nukleinsäuresequenzen angeordnet ist und in Bezug auf besagte Nukleinsäuresequenz heterogen ist und mit besagten Nukleinsäuresequenzen funktionell so verknüpft ist, dass in mindestens einer pflanzlichen Zelle die Expression von zwei unterschiedlichen Ribonukleinsäuresequenzen bewirkt wird, wobei besagte Ribonukleinsäuresequenzen ausgewählt sind aus Ribonukleinsäuresequenzen kodierend für

20 15 i) Aminosäuresequenzen oder
ii) Ribonukleinsäuresequenzen, die eine Verminderung der Expression mindestens eines endogenen Gens besagter pflanzlichen Zelle bewirken.

25 20 Ferner betrifft die Erfindung ein Verfahren zur transgenen Expression von zwei Ribonukleinsäuresequenzen in pflanzlichen Zellen, wobei eine Expressionskassetten umfassend mindestens eine regulatorische Sequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

30 25 a) dem Promotor gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2,

35 30 b) funktionellen Äquivalenten des Promotor gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2, die eine Identität von mindestens 80% zu der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2 aufweisen und die im wesentlichen die gleiche Promotoraktivität wie der Promotor gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2 besitzen,

40 35 b) funktionellen Äquivalenten des Promotor gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2 welche mindestens 25 aufeinanderfolgende Nukleotide der Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2 umfassen und die im wesentlichen die gleiche Promotoraktivität wie der Promotor gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2 besitzen, und

45 40 c) funktionell äquivalente Fragmente der Sequenzen a) oder b) oder c), die mindestens 25 aufeinanderfolgende Nukleotide besagter Sequenzen a) oder b) oder c) aufweisen und im wesentlichen die gleiche Promotoraktivität wie der Promotor gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2 besitzen,

45 45 in mindestens eine pflanzliche Zelle eingebracht wird,

50 50 wobei besagtes regulatorisches Element zwischen zwei Nukleinsäuresequenzen angeordnet ist und in Bezug auf besagte Nukleinsäuresequenz heterogen ist und mit besagten Nukleinsäuresequenzen funktionell so verknüpft ist, dass in mindestens besagter pflanzlichen Zelle die Expression besagter zwei unterschiedlichen Ribo-

nukleinsäuresequenzen bewirkt wird, wobei besagte Ribonukleinsäuresequenzen ausgewählt sind aus Ribonukleinsäuresequenzen kodierend für

5 i) Aminosäuresequenzen oder
ii) Ribonukleinsäuresequenzen, die eine Verminderung der Expression mindestens eines endogenen Gens besagter pflanzlichen Zelle bewirken.

10 Die in der vorliegenden Erfindung als bidirektionaler Promotor zum Einsatz kommende DNA-Sequenz entspricht der intergenische Region zwischen einem putativen Ferredoxin (FD) Gen und einem putativen O-Acetyl-Serin-Lyase (OASTL) Gen in *Arabidopsis thaliana*.

15 Besonders gute Ergebnisse konnten in Pflanzen der Familie der Brassicaceae erzielt werden, wie beispielsweise *Arabidopsis* oder Raps. Aber auch in anderen Pflanzenarten (wie beispielsweise Tabak) konnten sehr gute Ergebnisse (insbesondere bei der Expression von Selektionsmarkern) erzielt werden. Die Expressionsaktivität ist im wesentlichen unabhängig von der Art der nachgeschalteten Nukleinsäure. Die Verwendung des bidirektionalen Promoters ist sowohl für die Expression von Selektionsmarkern als auch für jede andere Nukleinsäure geeignet.

20 20 In einer bevorzugten Ausführungsform sind daher die beiden in den erfindungsgemäßen Expressionskassetten umfassten transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen bzw. die unter dem erfindungsgemäßen Verfahren exprimierten Ribonukleinsäuresequenzen unterschiedlich. „Unterschiedlich“ heißt in diesem Zusammenhang, dass sich die transgen von beiden Seiten des bidirektionalen Promoters ausgehend exprimierten Ribonukleinsäuresequenzen in mindestens einer Base von einander unterscheiden. Bevorzugt kodieren beide Nukleinsäuresequenzen für unterschiedliche Proteine, bevorzugt für Proteine mit unterschiedlicher Funktion und/oder Aktivität.

30 30 Die Erfindung ermöglicht eine Erhöhung der Zahl von Transkriptionseinheiten bei einer verringerten Zahl von Promotorsequenzen. Im Fall von Translationsfusionen können auch mehr als zwei Proteine reguliert werden. Ein besonderer Vorteil dieser Erfindung ist, dass die Expression dieser multiplen Transgene unter der Kontrolle des bidirektionalen Promoters gleichzeitig und synchronisiert stattfindet. Der Promotor ist besonders gut für eine koordinierte Expression von Nukleinsäuren geeignet. So können gleichzeitig

40 i) Zielprotein und Selektionsmarker oder Reporterprotein
ii) Selektionsmarker und Reporterprotein
ii) Zwei Zielproteine z.B. aus dem gleichen Stoffwechselweg
iii) Sense und antisense RNA
iv) Verschiedene Proteine zur Pathogenabwehr

45 45 und vieles mehr exprimiert werden und verbesserte Effekte in den Pflanzen bewirken.

“Expression“ umfasst die Transkription der transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz, kann aber - im Falle eines offenen Leserasters in “sense”-Orientierung - auch

die Translation der transkribierten RNA der transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz in ein korrespondierendes Polypeptid mit einschließen.

5 „Expressionskassette zur transgenen Expression von Nukleinsäuren oder Verfahren zur transgenen Expression von Nukleinsäuren umfasst alle solche durch gentechnische Methoden zustande gekommene Konstruktionen oder Verfahren, in denen sich entweder

10 a) einer der erfindungsgemäßen Promotoren (z.B. der Promotor gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2 oder eines funktionellen Äquivalentes derselben), oder

b) die unter der Kontrolle besagten Promotors zu exprimierende Nukleinsäuresequenz, oder

15 c) (a) und (b)

20 sich nicht in ihrer natürlichen, genetischen Umgebung (d.h. an ihrem natürlichen chromosomalen Locus) befinden oder durch gentechnische Methoden modifiziert wurden, wobei die Modifikation beispielhaft eine Substitution, Addition, Deletion, Inversion oder Insertion eines oder mehrerer Nukleotidreste sein kann. In einer bevorzugten Ausführungsform ist die unter Kontrolle eines der erfindungsgemäßen Promotoren zu exprimierende Nukleinsäuresequenz heterolog in bezug auf besagten Promotor, d.h. die steht natürlicherweise nicht unter dessen Kontrolle, sondern besagte Kontrolle wurde (beispielsweise durch gentechnische Verfahren) in nicht-natürlicher Weise hergestellt.

25 Die erfindungsgemäßen Expressionskassetten, von ihnen abgeleitete Vektoren oder die erfindungsgemäßen Verfahren können funktionelle Äquivalente zu den unter SEQ ID NO: 1 oder 2 beschriebenen Promotorsequenzen umfassen. Funktionell äquivalente Sequenzen umfassen auch all die Sequenzen, die von dem komplementären Gegenstrang der durch SEQ ID NO: 1 oder 2 definierten Sequenzen abgeleitet sind und im wesentlichen die gleiche Promotoraktivität aufweisen. Funktionelle Äquivalente in bezug auf die erfindungsgemäßen Promotoren meint insbesondere natürliche oder künstliche Mutationen der unter SEQ ID NO: 1 oder 2 beschriebenen Promotorsequenzen sowie deren Homologe aus anderen Pflanzengattungen und -arten, welche weiterhin im wesentlichen die gleiche Promotoraktivität aufweisen.

30 Eine Promotoraktivität wird im wesentlichen als gleich bezeichnet, wenn die Transkription eines bestimmten zu exprimierenden Gens unter Kontrolle eines bestimmten von SEQ ID NO: 1 oder 2 abgeleiteten Promotors unter ansonsten unveränderten Bedingungen eine Lokalisation innerhalb der Pflanze aufweist, die zu mindestens 50%, bevorzugt mindestens 70%, besonders bevorzugt mindestens 90% ganz besonders bevorzugt mindestens 95% deckungsgleich ist mit einer Vergleichsexpression erhalten unter Verwendung eines des durch SEQ ID NO: 1 oder 2 beschriebenen Promotors.

35 40 45 Dabei kann die Expressionshöhe sowohl nach unten als auch nach oben im Vergleich zu einem Vergleichswert abweichen. Bevorzugt sind dabei solche Sequenzen, deren Expressionshöhe, gemessen anhand der transkribierten mRNA oder dem infolge translatierten Protein, unter ansonsten unveränderten Bedingungen quantitativ um nicht mehr als 50%, bevorzugt 25%, besonders bevorzugt 10 % sich von einem

Vergleichswert erhalten mit einem durch SEQ ID NO: 1 oder 2 beschriebenen Promotor unterschiedet. Besonders bevorzugt sind solche Sequenzen, deren Expressionshöhe, gemessen anhand der transkribierten mRNA oder dem infolge translatierten Protein, unter ansonsten unveränderten Bedingungen quantitativ um mehr als 50%, bevorzugt 100%, besonders bevorzugt 500%, ganz besonders bevorzugt 1000% eines Vergleichswert erhalten mit dem durch SEQ ID NO:1 beschriebenen Promotor übersteigt. Bevorzugt ist als Vergleichswert die Expressionshöhe der natürlichen mRNA des jeweiligen Gens oder des natürlichen Genproduktes. Bevorzugt ist ferner als Vergleichswert die Expressionshöhe erhalten mit einer beliebigen, aber bestimmten Nukleinsäuresequenz, bevorzugt solchen Nukleinsäuresequenzen, die für leicht quantifizierbare Proteine kodieren. Ganz besonders bevorzugt sind dabei Reporterproteine (Schenborn E & Groskreutz D (1999) Mol Biotechnol 13(1):29-44) wie das "Green Fluorescence Protein" (GFP) (Chui WL et al., Curr Biol 1996, 6:325-330; Leffel SM et al., Biotechniques. 23(5):912-8, 1997), die Chloramphenicoltransferase, eine 15 Luziferase (Millar et al., Plant Mol Biol Rep 1992 10:324-414) oder die β -Galactosidase, ganz besonders bevorzugt ist die β -Glucuronidase (Jefferson et al. (1987) EMBO J. 6:3901-3907).

Ansonsten unveränderte Bedingungen bedeutet, dass die Expression, die durch eine 20 der zu vergleichenden Expressionskassetten initiiert wird, nicht durch Kombination mit zusätzlichen genetischen Kontrollsequenzen, zum Beispiel Enhancer-Sequenzen, modifiziert wird. Unveränderte Bedingungen bedeutet ferner, dass alle Rahmenbedingungen wie beispielsweise Pflanzenart, Entwicklungsstadium der Pflanzen, Zuchtbedingungen, Testbedingungen (wie Puffer, Temperatur, Substrate etc.) zwischen den 25 zu vergleichenden Expressionen identisch gehalten werden.

Mutationen umfassen Substitutionen, Additionen, Deletionen, Inversionen oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleotidreste. Somit werden beispielsweise auch 30 solche Nukleinsäuresequenzen durch die vorliegende Erfindung mit umfasst, welche man durch Modifikation eines Promoters gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2 erhält. Ziel einer solchen Modifikation kann die weitere Eingrenzung der darin enthaltenen Sequenz oder z.B. auch die Einfügung weiterer Restriktionsenzymeschnittstellen, die Entfernung 35 überflüssiger DNA oder das Hinzufügen weiterer Sequenzen, zum Beispiel weiterer regulatorischer Sequenzen, sein.

Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen, wie z.B. Transitionen und Transversionen, in Frage kommen, können an sich bekannte Techniken, wie in vitro-Mutagenese, "primer repair", Restriktion oder Ligation verwendet werden. Durch 40 Manipulationen, wie z.B. Restriktion, "chewing-back" oder Auffüllen von Überhängen für "blunt ends" können komplementäre Enden der Fragmente für die Ligation zur Verfügung gestellt werden. Zu analogen Ergebnissen kann man auch unter Verwendung der Polymerasekettenreaktion (PCR) unter Verwendung spezifischer Oligonukleotid-Primer kommen.

Unter Identität zwischen zwei Nukleinsäuren wird die Identität der Nukleinsäuresequenz über die jeweils gesamte Sequenzlänge verstanden, die durch Vergleich mit 45 Hilfe des Programmalgorithmus GAP (Wisconsin Package Version 10.0, University of Wisconsin, Genetics Computer Group (GCG), Madison, USA) unter Einstellung

folgender Parameter berechnet wird:

Gap Weight: 12

Length Weight: 4

5 Average Match: 2,912

Average Mismatch:-2,003

Beispielhaft wird unter einer Sequenz, die eine Identität von mindestens 50 % auf Nukleinsäurebasis mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 aufweist, eine Sequenz verstanden, die bei einem Vergleich mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 nach obigem 10 Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz eine Identität von mindestens 50 % aufweist.

15 Funktionelle Äquivalente zu dem Promotor gemäß SEQ ID NO: 1 umfasst bevorzugt solche Sequenzen, die eine Identität aufweisen von mindestens 80 %, bevorzugt 90 %, besonders bevorzugt mindestens 95 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 98 %, am meisten bevorzugt 99% zu der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1 und weiterhin im wesentlichen die gleiche Promotoraktivität wie die Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1 aufweisen.

20 Funktionelle Äquivalente zu dem Promotor gemäß SEQ ID NO: 2 umfasst bevorzugt solche Sequenzen, die eine Identität aufweisen von mindestens 80 %, bevorzugt 90 %, besonders bevorzugt mindestens 95 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 98 %, am meisten bevorzugt 99% zu der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 2 und weiterhin im wesentlichen die gleiche Promotoraktivität wie die Sequenz gemäß SEQ ID NO: 2 aufweisen.

30 Weitere Beispiele für die in den erfindungsgemäßen Expressionskassetten oder Vektoren zum Einsatz kommenden Promotorsequenzen lassen sich beispielsweise in verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, wie beispielsweise aus *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus*, *Nicotiana tabacum*, *Solanum tuberosum*, *Helianthus annuus*, *Linum sativum* durch Identitätvergleiche in Datenbanken leicht auffinden.

35 35 Verfahren zur Herstellung erfindungsgemäßer funktioneller Äquivalente umfasst bevorzugt die Einführung von Mutationen in einen Promotor gemäß SEQ ID NO: 1. Eine Mutagenese kann ungerichtet ("random") erfolgen, wobei die mutagenisierten Sequenzen anschließend bezüglich ihrer Eigenschaften nach einer "trial-by-error" Prozedur durchmustert werden. Besonders vorteilhafte Selektionskriterien umfassen beispielsweise eine erhöht Resistenz gegenüber einem Selektionsmarker, die Höhe 40 der resultierenden Expression der eingeführten Nukleinsäuresequenz.

45 In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung können essentielle regulatorische Elemente der erfindungsgemäßen Promotoren gezielt isoliert und als solche oder in Kombination mit anderen regulatorischen Elementen eingesetzt werden. Folglich umfasst ein Gegenstand der Erfindung funktionellen Äquivalenten des Promotor gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2 welche mindestens 25, bevorzugt mindestens 50, besonders bevorzugt mindestens 100, ganz besonders bevorzugt mindestens 200, am meisten bevorzugt mindestens 400 aufeinanderfolgende Nukleotide der Sequenzen

gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2 umfassen und die im wesentlichen die gleiche Promotoraktivität wie der Promotor gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2 besitzen.

Alternativ können nicht-essentielle Sequenzen eines der erfindungsgemäßen Promotores deletiert werden ohne die genannten Eigenschaften signifikant zu beeinträchtigen.

5 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung umfasst daher funktionell äquivalente Fragmente einer der erfindungsgemäßen Promotorsequenzen, die mindestens 25, bevorzugt mindestens 50, besonders bevorzugt mindestens 100, ganz besonders bevorzugt mindestens 200, am meisten bevorzugt mindestens 400

10 aufeinanderfolgende Nukleotide einer der erfindungsgemäßen Promotorsequenzen aufweisen und im wesentlichen die gleiche Promotoraktivität wie der Promotor gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2 besitzen.

Die Eingrenzung der Promotorsequenz auf bestimmte, essentielle regulatorische Regionen kann auch mit Hilfe von Suchroutine zur Suche von Promotorelementen

15 vorgenommen werden. Oft sind in den für die Promotoraktivität relevanten Regionen bestimmte Promotorelemente gehäuft vorhanden. Diese Analyse kann beispielsweise mit Computerprogrammen wie dem Programm PLACE ("Plant Cis-acting Regulatory DNA Elements") vorgenommen werden (Higo K et al. (1999) Nucleic Acids Res 27:1, 297-300) oder der BIOBASE Datenbank "Transfac" (Biologische Datenbanken GmbH, Braunschweig).

Verfahren zur Mutagenisierung von Nukleinsäuresequenzen sind dem Fachmann bekannt und schließen beispielhaft die Verwendung von Oligonukleotiden mit einer oder mehr Mutationen im Vergleich zu der zu mutierenden Region ein (z.B. im Rahmen einer "Site-specific mutagenesis"). Typischerweise kommen Primer mit ungefähr 15 bis

25 ungefähr 75 Nukleotiden oder mehr zum Einsatz, wobei bevorzugt ca. 10 bis ca. 25 oder mehr Nukleotidreste an beiden Seiten der zu verändernden Sequenz lokalisiert sind. Details und Durchführung besagter Mutageneseverfahren sind dem Fachmann geläufig (Kunkel et al. (1987) Methods Enzymol 154:367-382; Tomic et al. (1990) Nucl Acids Res 12:1656; Upender et al. (1995) Biotechniques 18(1):29-30; US 4,237,224). Eine Mutagenese kann auch durch Behandlung von beispielsweise Vektoren, die eine der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen enthalten, mit mutagenisierenden Agentien wie Hydroxylamin realisiert werden.

35 Die in den erfindungsgemäßen Expressionskassetten enthaltenen transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen können mit weiteren genetischen Kontrollsequenzen neben einem der erfindungsgemäßen Promotoren funktionell verknüpft sein.

40 Unter einer funktionellen Verknüpfung versteht man zum Beispiel die sequentielle Anordnung eines Promoters, der transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz und ggf. weiterer regulativer Elemente wie zum Beispiel einem Terminator derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der transgenen Expression der Nukleinsäuresequenz, je nach Anordnung der Nukleinsäuresequenzen zu sense oder anti-sense RNA, erfüllen kann. Dazu ist nicht unbedingt eine direkte Verknüpfung im chemischen Sinne erforderlich. Genetische Kontrollsequenzen, wie zum Beispiel Enhancer-Sequenzen, können ihre Funktion auch von weiter entfernten Positionen oder gar von anderen DNA-Molekülen aus auf die Zielsequenz ausüben. Bevorzugt sind Anordnungen, in denen die transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz

hinter der als Promotor fungierenden Sequenz positioniert wird, so dass beide Sequenzen kovalent miteinander verbunden sind. Bevorzugt ist dabei der Abstand zwischen der Promotorsequenz und der transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz geringer als 200 Basenpaare, besonders bevorzugt kleiner als 100 Basenpaare, ganz besonders bevorzugt kleiner als 50 Basenpaare.

5 Die Herstellung einer funktionellen Verknüpfung kann mittels gängiger Rekombinations- und Klonierungstechniken realisiert werden, wie sie beispielsweise in Maniatis T et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 10 Cold Spring Harbor, NY sowie in Silhavy TJ et al. (1984) Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY und in Ausubel FM et al. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and 15 Wiley Interscience beschrieben sind. Zwischen beide Sequenzen können aber auch weitere Sequenzen positioniert werden, die zum Beispiel die Funktion eines Linkers mit bestimmten Restriktionsenzymeschnittstellen oder eines Signalpeptides haben. Auch kann die Insertion von Sequenzen zur Expression von Fusionsproteinen führen.

20 Der Begriff der genetischen Kontrollsequenzen ist breit zu verstehen und meint all solche Sequenzen, die einen Einfluss auf das Zustandekommen oder die Funktion der erfindungsgemäßen Expressionskassette haben. Genetische Kontrollsequenzen modifizieren zum Beispiel die Transkription und Translation in prokaryotischen oder eukaryotischen Organismen. Vorzugsweise umfassen die erfindungsgemäßen Expressionskassetten 5'-stromaufwärts von der jeweiligen transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz einen der erfindungsgemäßen Promotoren und 3'-stromabwärts eine Terminatorsequenz als zusätzliche genetische Kontrollsequenz, sowie gegebenenfalls weitere übliche regulative Elemente, und zwar jeweils funktionell verknüpft mit der transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz.

25

30 Genetische Kontrollsequenzen umfassen auch weitere Promotoren, Promotorelemente oder Minimalpromotoren, die die expressionsteuernden Eigenschaften modifizieren können. So kann durch genetische Kontrollsequenzen zum Beispiel die gewebespezifische Expression zusätzlich abhängig von bestimmten Stressfaktoren erfolgen. Entsprechende Elemente sind zum Beispiel für Wasserstress, Abscisinsäure (Lam E und Chua NH, (1991) J Biol Chem 266(26):17131-17135) und Hitzestress (Schöffl F et al. (1989) Mol Gen Genetics 217(2-3):246-53) beschrieben.

35

40 Es können ferner weitere Promotoren funktionell mit der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz verknüpft sein, die eine Expression in weiteren Pflanzengeweben oder in anderen Organismen, wie zum Beispiel *E.coli* Bakterien ermöglichen. Als Pflanzenpromotoren kommen im Prinzip alle oben beschriebenen Promotoren in Frage. Vorstellbar ist zum Beispiel, dass eine bestimmte Nukleinsäuresequenz durch einen Promotor (zum Beispiel einen der erfindungsgemäßen Promotoren) in einem Pflanzengewebe als sense-RNA transkribiert und in das entsprechende Protein translatiert wird, während die gleiche Nukleinsäuresequenz durch einen anderen Promotor mit einer anderen Spezifität in einem anderen Gewebe zu anti-sense-RNA transkribiert und das entsprechende Protein herunterreguliert wird. Dieses kann durch eine erfindungsgemäße Expressionskassette realisiert werden, indem der eine Promotor vor die transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz positioniert wird und der andere Promotor dahinter.

45

Genetische Kontrollsequenzen umfassen ferner auch die 5'-untranslatierte Region, Introns oder die nichtkodierende 3'-Region von Genen, bevorzugt des pFD Genes und/oder des OASTL Genes. Es ist gezeigt worden, dass untranslatierte Regionen

5 eine signifikante Funktionen bei der Regulation der Genexpression spielen können. So wurde gezeigt, dass 5'-untranslatierte Sequenzen die transiente Expression heterologer Gene verstärken können. Sie können ferner die Gewebebespezifität fördern (Rouster J et al.(1998) Plant J. 15:435-440.). Umgekehrt unterdrückt die 5'-untranslatierte Region des opaque-2 Gens die Expression. Eine Deletion der entsprechenden 10 Region führt zu einer Erhöhung der Genaktivität (Lohmer S et al. (1993) Plant Cell 5:65-73). Die unter SEQ ID NO: 2 angegebene Nukleinsäuresequenz enthält den Abschnitt des FD-Gens und des OASTL Gens, der den Promotor und die 5'-untranslatierte Region bis vor das ATG-Startcodon des jeweiligen Proteins repräsentiert. In der 15 5' untranslatierten Region des OASTL Gens befindet sich ein Intron, was durch die Struktur der cDNA Klone belegt werden kann. Die Introngrenzen liegen bei 14 bp (3' Seite des Introns) und 281 bp (5'Seite des Introns). Basenpaar Nummerierung entsprechend der Nummerierung des Promotors gemäß SEQ ID NO: 2. Das Intron hat eine starke expressionsfördernde Funktion in beide Transkriptionsrichtungen. Dies könnte durch die Existenz eines Enhancers in dieser Region begründet sein.

20 25 In einer bevorzugten Ausführungsform ist daher der erfindungsgemäß bidirektionale Promotor beschrieben durch die Sequenz gemäß SEQ ID NO: 2 oder durch Sequenzen die eine Identität von mindestens 80%, bevorzugt mindestens 90%, besonders bevorzugt mindestens 95%, ganz besonders bevorzugt mindestens 98%, am meisten bevorzugt mindestens 99% zu der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 2 haben.

30 35 Weitere 5'-untranslatierte Sequenzen sowie Introns mit expressionsfördernder Funktion sind dem Fachmann bekannt. McElroy und Mitarbeiter (McElroy et al. (1991) Mol Genet 231(1):150-160) berichteten von einem auf dem Reis Actin 1 (Act1) Promotor basierenden Konstrukt zur Transformation monokotyler Pflanzen. In transgenen Reiszellen führte die Verwendung des Act1-Introns in Kombination mit dem 35S-Promotor zu einer gegenüber dem isolierten 35S-Promotor um das Zehnfache gesteigerten Expressionsrate. Eine Optimierung der Sequenzumgebung der Translations-Initiationsstelle des Reporter-Gens (GUS) resultierte in einer vierfachen Steigerung der GUS-Expression in transformierten Reiszellen. Eine Kombination der optimierten Translations-Initiationsstelle und des Act1-Introns resultierte in einer 40-fachen Steigerung der GUS-Expression durch den CaMV35S-Promotor in transformierten Reiszellen; ähnliche Ergebnisse wurden anhand von transformierten Maiszellen erzielt. Insgesamt wurde aus den zuvor beschriebenen Untersuchungen geschlussfolgert, dass die auf dem Act1-Promotor basierenden Expressionsvektoren dazu geeignet sind, eine hinreichend starke und konstitutive Expression von Fremd-DNA in transformierten Zellen monokotyler Pflanzen zu steuern.

40 45 Die Expressionskassette kann eine oder mehrere sogenannte "Enhancer"-Sequenzen funktionell verknüpft mit dem Promotor enthalten, die eine erhöhte transgene Expression der Nukleinsäuresequenz ermöglichen. Auch am 3'-Ende der transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen können zusätzliche vorteilhafte Sequenzen inseriert werden, wie weitere regulatorische Elemente oder Terminatoren. Die transgen

zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen können in einer oder mehreren Kopien in einer der erfindungsgemäßen Expressionskassetten enthalten sein.

Als Kontrollsequenzen sind weiterhin solche zu verstehen, die eine homologe Rekombination bzw. Insertion in das Genom eines Wirtsorganismus ermöglichen oder die Entfernung aus dem Genom erlauben. Bei der homologen Rekombination kann zum Beispiel der natürliche Promotor eines bestimmten Gens gegen einen der erfindungsgemäßen Promotoren ausgetauscht werden. Methoden wie die cre/lox-Technologie erlauben eine gewebespezifische, unter Umständen induzierbare Entfernung der Expressionskassette aus dem Genom des Wirtsorganismus (Sauer B. (1998) Methods. 14(4):381-92). Hier werden bestimmte flankierende Sequenzen dem Zielgen angefügt (lox-Sequenzen), die später eine Entfernung mittels der cre-Rekombinase ermöglichen.

Der einzuführende Promotor kann mittels homologer Rekombination vor das transgen zu exprimierende Zielgen platziert werden, indem der Promotor mit DNA-Sequenzen verknüpft wird, die zum Beispiel zu endogenen Sequenzen homolog sind, die dem Leseraster des Zielgens vorgelagert sind. Derartige Sequenzen sind als genetische Kontrollsequenzen zu verstehen. Nachdem eine Zelle mit dem entsprechenden DNA-Konstrukt transformiert wurde, können die beiden homologen Sequenzen interagieren und so die Promotorsequenz an dem gewünschten Ort vor dem Zielgen platzieren, so dass die Promotorsequenz nun in funktioneller Verknüpfung mit dem Zielgen steht und eine erfindungsgemäße Expressionskassette bildet. Die Auswahl der homologen Sequenzen bestimmt den Insertionsort des Promotors. Hierbei kann die Expressionskassette durch homologe Rekombination mittels einer einfachen oder einer doppelten-reziproken Rekombination generiert werden. Bei der einfach reziproken Rekombination wird nur eine einzelne Rekombinationssequenz verwendet und es erfolgt die Insertion der gesamten eingeführten DNA. Bei der doppelt-reziproken Rekombination ist die einzuführende DNA durch zwei homologe Sequenzen flankiert und es erfolgt die Insertion des flankierten Bereiches. Letzteres Verfahren ist geeignet, um wie oben beschrieben den natürlichen Promotor eines bestimmten Gens gegen einen der erfindungsgemäßen Promotoren auszutauschen und so den Expressionsort und -zeitpunkt dieses Gens zu modifizieren. Diese funktionelle Verknüpfung stellt eine erfindungsgemäße Expressionskassette dar.

Zur Selektion erfolgreich homolog rekombinierter oder auch transformierter Zellen ist es in der Regel erforderlich, einen selektionierbaren Marker zusätzlich einzuführen. Verschiedene geeignete Marker sind unten genannt. Der Selektionsmarker erlaubt die Selektion der transformierten Zellen von untransformierten. Homologe Rekombination ist ein relativ seltenes Ereignis in höheren Eukaryoten, vor allem in Pflanzen. Zufällige Integrationen in das Wirtsgenom überwiegen. Eine Möglichkeit die zufällig integrierten Sequenzen zu entfernen und so Zellklone mit einer korrekten homologen Rekombination anzureichern, besteht in der Verwendung eines sequenzspezifischen Rekombinationssystems wie in US 6,110,736 beschrieben.

Als Kontrollsequenzen geeignete Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, sowie - vorzugsweise - solche aus *Agrobacterium tumefaciens*. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform enthält die Expressionskassette eine in Pflanzen funktionelle Terminatorsequenz. In Pflanzen funktionelle Terminatorsequenzen meint allgemein solche Sequenzen, die in der Lage sind, in Pflanzen den

12

Abbruch der Transkription einer DNA-Sequenz zu bewirken. Beispiele für geeignete Terminatorsequenzen sind der OCS (Octopin-Synthase)-Terminator und der NOS (Nopalin-Synthase)-Terminator. Besonders bevorzugt sind jedoch pflanzliche Terminatorsequenzen. Pflanzliche Terminatorsequenzen meint allgemein solche Sequenzen,

5 die Bestandteil eines natürlichen pflanzlichen Gens sind. Besonders bevorzugt sind dabei der Terminators des Cathepsin D Inhibitor Gens aus Kartoffel (GenBank Acc. No.: X74985) oder des Terminators der Speicherproteingens VfLEIB3 (GenBank Acc. No.: Z26489) aus der Ackerbohne. Diese Terminatoren sind den im Stand der Technik beschriebenen viralen oder T-DNA Terminatoren mindestens gleichwertig.

10 Dem Fachmann ist eine Vielzahl von Nukleinsäuren bzw. Proteinen bekannt, deren rekombinante Expression gesteuert durch die erfundungsgemäßen Expressionskassetten oder Verfahren vorteilhaft ist. Ferner sind dem Fachmann eine Vielzahl von Genen bekannt, durch deren Reprimierung oder Ausschaltung mittels Expression einer 15 entsprechenden antisense-RNA ebenfalls vorteilhafte Effekte erreicht werden können. Beispielhaft jedoch nicht einschränkend für vorteilhafte Effekte seien zu nennen:

• - Erleichterte Herstellung eines transgenen Organismus beispielsweise durch die Expression von Selektionsmarkern

20 - Erzielen einer Resistenz gegen abiotische Stressfaktoren (Hitze, Kälte, Trockenheit, erhöhte Feuchtigkeit, Umweltgifte, UV-Strahlung)

25 - Erzielen einer Resistenz gegen biotische Stressfaktoren (Pathogene, Viren, Insekten und Krankheiten)

- Verbesserung von Nahrungs- oder Futtereigenschaften

30 - Verbesserung der Wachstumsrate oder des Ertrages.

Nachfolgend seien einige konkrete Beispiele für Nukleinsäuren genannt, deren Expression die gewünschten vorteilhaften Effekte bietet:

35 1. Selektionsmarker

Selektionsmarker umfasst sowohl positive Selektionsmarker, die eine Resistenz gegen ein Antibiotikum, Herbizid oder Biozid verleihen, als auch negative Selektionsmarker, die eine Sensitivität gegen eben diese verleihen, als auch Marker die dem transformierten Organismus einen Wachstumsvorteil gewähren (beispielsweise durch Expression von Schlüsselgenen der Cytokinbiosynthese; Ebinuma H et al. (2000) Proc Natl Acad Sci USA 94:2117-2121). Bei der positiven Selektion gedeihen nur die Organismen, die den entsprechenden Selektionsmarker exprimieren, während bei der negativen Selektion eben diese eingehen. Bei der Herstellung transgener Pflanzen ist die Verwendung eines positiven Selektionsmarkers bevorzugt. Bevorzugt ist ferner die Verwendung von Selektionsmarkern, die Wachstumsvorteile verleihen. Negative Selektionsmarker können vorteilhaft verwendet werden, wenn es darum geht, bestimmte Gene oder Genomabschnitte aus einem Organismus zu entfernen (beispielsweise im Rahmen eines Kreuzungsprozesses).

Der mit der Expressionskassette eingebrachte selektionierbare Marker verleiht den erfolgreich rekombinierten oder transformierten Zellen eine Resistenz gegen ein Biozid (zum Beispiel ein Herbizid wie Phosphinothricin, Glyphosat oder Bromoxynil), einen Metabolismusinhibitor wie 2-Desoxyglucose-6-phosphat (WO 98/45456) oder ein Antibiotikum, wie zum Beispiel Kanamycin, G 418, Bleomycin, Hygromycin. Der Selektionsmarker erlaubt die Selektion der transformierten Zellen von untransformierten (McCormick et al. (1986) Plant Cell Rep 5:81-84). Besonders bevorzugte Selektionsmarker sind solche die eine Resistenz gegen Herbizide verleihen. Dem Fachmann sind zahlreiche derartiger Selektionsmarker und die für diese kodierenden Sequenzen bekannt. Nachfolgend seien beispielhaft jedoch nicht einschränkend zu nennen:

5 i) Positive Selektionsmarker:

15 Der mit der Expressionskassette eingebrachte selektionierbare Marker verleiht der erfolgreich transformierten Zellen eine Resistenz gegen ein Biozid (zum Beispiel ein Herbizid wie Phosphinothricin, Glyphosat oder Bromoxynil), einen Metabolismusinhibitor wie 2-Desoxyglucose-6-phosphat (WO 98/45456) oder ein Antibiotikum, wie zum Beispiel Tetracyclin, Ampicillin, Kanamycin, G 418, Neomycin, Bleomycin oder Hygromycin. Der Selektionsmarker erlaubt die Selektion der transformierten Zellen von untransformierten (McCormick et al. (1986) Plant Cell Reports 5:81-84). Besonders bevorzugte Selektionsmarker sind solche die eine Resistenz gegen Herbizide verleiht. Beispieldhaft als Selektionsmarker seien genannt:

20 - DNA Sequenzen, die für Phosphinothricinacetyltransferasen (PAT; auch Bialaphos-Resistenzgen (bar) genannt) kodieren und eine Detoxifizierung des Herbizids Phosphinothricin (PPT) bewirken (de Block et al. (1987) EMBO J 6:2513-2518). Geeignete bar Gene können aus beispielsweise *Streptomyces hygroscopicus* oder *S. viridochromogenes* isoliert werden. Entsprechende Sequenzen sind dem Fachmann bekannt (GenBank Acc.-No.: X17220, X05822, M22827, X65195; US 5,489,520). Ferner sind synthetische Gene beispielsweise für die Expression in Plastiden beschrieben AJ028212. Ein synthetisches Pat Gen ist beschrieben bei Becker et al. (1994) Plant J 5:299-307. Die Gene verleihen Resistenz gegen das Herbizid Bialaphos und sind ein vielbenutzter Marker in transgenen Pflanzen (Vickers JE et al. (1996) Plant Mol Biol Rep 14:363-368; Thompson CJ et al. (1987) EMBO J 6:2519-2523).

25 - 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphatsynthasegene (EPSP Synthasegene), die eine Resistenz gegen Glyphosat (N-(phosphonomethyl)glycin) verleihen (Steinrucken HC et al. (1980) Biochem Biophys Res Commun 94:1207-1212; Levin JG und. Sprinson DB (1964) J Biol Chem 239:1142-1150; Cole DJ (1985) Mode of action of glyphosate; A literature analysis, p. 48-74. In: Grossbard E und Atkinson D (eds.). The herbicide glyphosate. Butterworths, Boston.). Glyphosat-tolerante EPSPS Varianten werden bevorzugt als Selektionsmarker verwendet (Padgett SR et al. (1996). New weed control opportunities: development of soybeans with a Roundup Ready™ gene. In: Herbicide Resistant Crops (Duke SO ed.), pp. 53-84. CRC Press, Boca Raton, FL; Saroha MK und Malik VS (1998) J Plant Biochem Biotechnol 7:65-72). Das EPSPS Gen des Agrobacterium sp. strain CP4 hat eine natürliche Toleranz gegen Glyphosat, die auf entsprechende transgene Pflanzen transferiert werden kann (Padgett SR et al. (1995) Crop Science 35(5):1451-1461). 5-Enol-

pyrvylshikimate-3-phosphate-synthasen, die Glyphosat-tolerant sind, sind beispielsweise beschrieben in US 5,510,471; US 5,776,760; US 5,864,425; US 5,633,435; US 5,627,061; US 5,463,175; EP 0 218 571. Weitere Sequenzen sind beschrieben unter GenBank Accession X63374. Ferner ist das aroA Gen bevorzugt (M10947).

5 - das für das Glyphosat degradierende Enzyme kodierende gox Gen (Glyphosatoxidoreduktase aus *Achromobacter* sp.). GOX kann eine Resistenz gegen Glyfosat vermitteln (Padgette SR et al. (1996) *J Nutr.* 126(3):702-16; Shah D et al. (1986) *Science* 233: 478-481).

10 - das deh Gen (kodierend für eine Dehalogenase, die Dalapon inaktiviert), (GenBank Acc.-No.: AX022822, AX022820 sowie WO99/27116)

15 - bxn Gene, die für Bromoxynil degradierende Nitrilaseenzyme kodieren. Beispielsweise die Nitrilase aus *Klebsiella ozanenae*. Sequenzen sind in der GenBank beispielweise unter den Acc.-No: E01313 und J03196 zu finden.

20 - Neomycinphosphotransferasen verleihen eine Resistenz gegen Antibiotika (Aminoglykoside) wie Neomycin, G418, Hygromycin, Paromomycin oder Kanamycin, indem sie durch eine Phosphorylierungsreaktion deren Inhibierende Wirkung reduzieren. Besonders bevorzugt ist das nptII Gen. Sequenzen können aus der GenBank erhalten werden (AF080390 Minitransposon mTn5-GNm; AF080389 Minitransposon mTn5-Nm, complete sequence). Zudem ist das Gen bereits Bestandteil zahlreicher Expressionsvektoren und kann unter Verwendung von dem Fachmann geläufigen Verfahren (wie beispielsweise Polymerasekettenreaktion) aus diesen isoliert werden (AF234316 pCAMBIA-2301; AF234315 pCAMBIA-2300, AF234314 pCAMBIA-2201). Das NPTII Gen kodiert für eine Aminoglycosid-3'-O-phosphotransferase aus *E.coli*, Tn5 (GenBank Acc.-No: U00004 Position 1401-2300; Beck et al. (1982) Gene 19 327-336).

25 - das DOG^R1-Gen. Das Gen DOG^R1 wurde aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* isoliert (EP 0 807 836). Es codiert für eine 2-Desoxyglukose-6-phosphat Phosphatase, die Resistenz gegenüber 2-DOG verleiht (Randez-Gil et al. 1995, Yeast 11, 1233-1240; Sánz et al. (1994) Yeast 10:1195- 1202, Sequenz: GenBank Acc.-No.: NC001140 chromosom VIII, *Saccharomyces cerevisiae* Position 194799-194056).

30 - Sulfonlharnstoff- und Imidazolinon inaktivierende Acetolactatsynthasen, die eine Resistenz gegen Imidazolinon/Sulfonlharnstoff-Herbizide verleihen. Geeignet sind beispielsweise die unter der GenBank Acc-No.: X51514 hinterabgelegte Sequenz für das *Arabidopsis thaliana* Csr 1.2 Gen (EC 4.1.3.18) (Sathasivan K et al. (1990) *Nucleic Acids Res.* 18(8):2188). Acetolactatesynthasen die eine Resistenz gegen Imidazolinon-Herbizide verleihen sind ferner beschrieben unter den GenBank Acc.-No.: AB049823, AF094326, X07645, X07644, A19547, A19546, A19545, I05376, I05373, AL133315.

35 - Hygromycinphosphotransferasen (X74325 *P. pseudomallei* gene for hygromycin phosphotransferase) die eine Resistenz gegen das Antibiotikum Hygromycin verleihen. Das Gen ist Bestandteil zahlreicher Expressionsvektoren und kann unter

Verwendung von dem Fachmann geläufigen Verfahren (wie beispielsweise Polymerasekettenreaktion) aus diesen isoliert werden (AF294981 pINDEX4; AF234301 pCAMBIA-1380; AF234300 pCAMBIA-1304; AF234299 pCAMBIA-1303; AF234298 pCAMBIA-1302; AF354046 pCAMBIA-1305.; AF354045 pCAMBIA-1305.1)

5 - Resistenzgene gegen

- a) Chloramphenicol (Chloramphenicolacetyltransferase),
- 10 b) Tetracyclin, verschiedene Resistenzgene sind beschrieben z.B. X65876 S. ordonez genes class D tetA and tetR for tetracycline resistance and repressor proteins X51366 *Bacillus cereus* plasmid pBC16 tetracycline resistance gene. Zudem ist das Gen bereits Bestandteil zahlreicher Expressionsvektoren und kann unter Verwendung von dem Fachmann geläufigen Verfahren (wie beispielsweise Polymerasekettenreaktion) aus diesen isoliert werden
- 15 c) Streptomycin, verschiedene Resistenzgene sind beschrieben z.B. mit der Gen-Bank Acc.-No.:AJ278607 *Corynebacterium acetoacidophilum* ant gene for streptomycin adenylyltransferase.
- 20 d) Zeocin, das entsprechende Resistenzgen ist Bestandteil zahlreicher Klonierungsvektoren (z.B. L36849 Cloning vector pZEO) und kann unter Verwendung von dem Fachmann geläufigen Verfahren (wie beispielsweise Polymerasekettenreaktion) aus diesen isoliert werden.
- 25 e) Ampicillin (β -Lactamase Gen; Datta N, Richmond MH.(1966) Biochem J. 98(1):204-9; Heffron F et al (1975) J. Bacteriol 122: 250-256; das Amp Gen wurde zuerst zur Herstellung des *E. coli* Vektors pBR322 kloniert; Bolivar F et al. (1977) Gene 2:95-114). Die Sequenz ist Bestandteil zahlreicher Klonierungsvektoren und kann unter Verwendung von dem Fachmann geläufigen Verfahren (wie beispielsweise Polymerasekettenreaktion) aus diesen isoliert werden.
- 30
- 35 - Gene wie die Isopentenyltransferase aus *Agrobacterium tumefaciens* (strain:PO22) (Genbank Acc.-No.: AB025109). Das ipt Gen ist ein Schlüsselenzym der Cytokin-Biosynthese. Seine Überexpression erleichtert die Regeneration von Pflanzen (z.B. Selektion auf Cytokin-freiem Medium). Das Verfahren zur Nutzung des ipt Gens ist beschrieben (Ebinuma H et al. (2000) Proc Natl Acad Sci USA 94:2117-2121; Ebinuma H et al. (2000) Selection of Marker-free transgenic plants using the onco-genes (ipt, roi A, B, C) of *Agrobacterium* as selectable markers, In Molecular Biology of Woody Plants. Kluwer Academic Publishers).
- 40

Verschiedene weitere positive Selektionsmarker, die den transformierten Pflanzen einen Wachstumsvorteil gegenüber nicht-transformierten verleihen, sowie Verfahren zu ihrer Verwendung sind u.a. beschrieben in EP-A 0 601 092. Beispielhaft sind zu nennen β -Glucuronidase (in Verbindung mit z.B. Cytokininglucuronid), Mannose-6-phosphat-Isomerase (in Verbindung mit Mannose), UDP-Galaktose-4-Epimerase (in Verbindung mit z.B. Galactose), wobei Mannose-6-phosphat-Isomerase in Verbindung mit Mannose besonders bevorzugt ist.

ii) Negative Selektionsmarker

Negative Selektionsmarker ermöglichen beispielsweise die Selektion von Organismen mit erfolgreich deletierten Sequenzen, die das Markergen umfassen (Koprek T et al.

5 (1999) Plant J 19(6):719-726). Bei der negativen Selektion wird beispielsweise durch den in die Pflanze eingebrachten negativen Selektionsmarker eine Verbindung, die ansonsten für die Pflanze keine nachteilige Wirkung hat, in eine Verbindung mit nachteiliger Wirkung umgesetzt. Ferner sind Gene geeignet, die per se eine nachteilige Wirkung haben, wie zum Beispiel Thymidinkinase (TK), Diphtheria Toxin A Fragment (DT-A), das codA Genprodukt kodierend für eine Cytosindeaminase (Gleave AP et al.

10 (1999) Plant Mol Biol. 40(2):223-35; Perera RJ et al. (1993) Plant Mol. Biol 23(4): 793-799; Stougaard J (1993) Plant J 3:755-761), das Cytochrom P450 Gen (Koprek et al. (1999) Plant J 16:719-726), Gene kodierend für eine Haloalkan Dehalogenase (Naested H (1999) Plant J 18:571-576), das IaaH Gen (Sundaresan V et al. (1995) 15 Genes & Development 9:1797-1810) oder das tms2 Gen (Fedoroff NV & Smith DL (1993) Plant J 3:273-289).

Die jeweils für die Selektion verwendeten Konzentrationen der Antibiotika, Herbizide, 20 Biocide oder Toxine müssen an die jeweiligen Testbedingungen bzw. Organismen angepasst werden. Beispielhaft seien für Pflanzen zu nennen Kanamycin (Km) 50 mg/l, Hygromycin B 40 mg/l, Phosphinothricin (Ppt) 6 mg/l.

Ferner können funktionelle Analoga der genannten Nukleinsäuren kodierend 25 für Selektionsmarker exprimiert werden. Funktionelle Analoga meint hier all die Sequenzen, die im wesentlichen die gleiche Funktion haben d.h. zu einer Selektion transformierter Organismen befähigt sind. Dabei kann das funktionelle Analogon sich in anderen Merkmalen durchaus unterscheiden. Es kann zum Beispiel eine höhere oder niedrigere Aktivität haben oder auch über weitere Funktionalitäten verfügen.

30 2. Verbesserter Schutz der Pflanze gegen abiotische Stressfaktoren wie Trockenheit, Hitze, oder Kälte zum Beispiel durch Überexpression von "antifreeze"- Peptiden aus Myoxocephalus Scorpis (WO 00/00512), Myoxocephalus octodecemspinosis, dem Arabidopsis thaliana Transkriptionsaktivator CBF1, Glutamat-dehydrogenasen (WO 97/12983, WO 98/11240), Calcium-abhängigen Protein-kinasegenen (WO 98/26045), Calcineurinen (WO 99/05902), Farnesyltransferasen (WO 99/06580), Pei ZM et al., Science 1998, 282: 287-290), Ferritin (Deak M et al., Nature Biotechnology 1999, 17:192-196), Oxalatoxidase (WO 99/04013; Dunwell JM Biotechnology and Genetic Engineering Reviews 1998, 15:1-32), DREB1A-Faktor (dehydration response element B 1A; Kasuga M et al., Nature Biotechnology 1999, 17:276-286), Genen der Mannitol- oder Trehalosesynthese wie der Trehalosephosphatsynthase oder der Trehalosephosphatphosphatase (WO 97/42326), oder durch Inhibition von Genen wie der Trehalase (WO 97/50561). Besonders bevorzugt sind Nukleinsäuren, die für den 35 transkriptionellen Aktivator CBF1 aus Arabidopsis thaliana (GenBank Acc.-No.: U77378) oder das "antifreeze protein" aus Myoxocephalus octodecemspinosis (GenBank Acc.-No.: AF306348) oder funktionelle Äquivalente derselben kodieren.

40

45

3. Expression von Stoffwechselenzymen zur Verwendung im Futter- und Nahrungsmittebereich, zum Beispiel die Expression von Phytase und Cellulasen. Besonders bevorzugt sind Nukleinsäuren wie die künstliche für eine mikrobielle Phytase kodierende cDNA (GenBank Acc.-No.: A19451) oder funktionelle Äquivalente derselben.

5. 4. Erreichen einer Resistenz zum Beispiel gegen Pilze, Insekten, Nematoden und Krankheiten durch gezielte Absonderung oder Anreicherung bestimmter Metaboliten oder Proteine in der Epidermis des Embryos. Beispielhaft seien genannt Glucosinolate (Abwehr von Herbivoren), Chitinases oder Glucanases und andere Enzyme die die Zellwand von Parasiten zerstören, Ribosom-inaktiverende Proteine (RIPs) und andere Proteine der pflanzlichen Resistenz- und Stressreaktion, wie sie bei Verletzung oder mikrobiellem Befall von Pflanzen oder chemisch durch zum Beispiel Salicylsäure, Jasmonsäure oder Ethylen induziert werden, Lysozyme aus nicht-pflanzlichen Quellen wie zum Beispiel T4 Lysozym oder Lysozym aus verschiedenen Säugern, insektizide Proteine wie *Bacillus thuringiensis* Endotoxin, α -Amylaseinhibitor oder Proteaseinhibitoren (cowpea Trypsininhibitor), Glucanases, Lectinen wie Phytohemagglutinin, Weizenkeimagglutinin, RNAsen oder Ribozyme. Besonders bevorzugt sind Nukleinsäuren, die für die chit42 Endochitinase aus *Trichoderma harzianum* (GenBank Acc.-No.: S78423) oder für das N-hydroxylierende, multifunktionelle Cytochrom P-450 (CYP79) Proteine aus *Sorghum bicolor* (GenBank Acc.-No.: U32624) oder funktionelle Äquivalente derselben kodieren.

25. 5. Bekannt ist die Akkumulation von Glucosinolaten in Pflanzen der Gattung der Cardales insbesondere der Ölsaaten zum Schutz vor Schädlingen (Rask L et al.(2000) Plant Mol Biol 42:93-113; Menard R et al. (1999) Phytochemistry 52:29-35), die Expression des *Bacillus thuringiensis* Endotoxin unter Kontrolle des 35 S CaMV Promotors (Vaeck et al. (1987) Nature 328:33-37) oder der Schutz des Tabaks gegen Pilzbefall durch Expression einer Chitinase aus der Bohne unter Kontrolle des CaMV Promotors (Broglié et al. (1991) Science 254:1194-119.

35. Die Expression synthetischer cryIA(b) and cryIA(c) Gene, die für Lepidopteren-spezifische delta-Endotoxine aus *Bacillus thuringiensis* kodieren, kann in verschiedenen Pflanzen eine Resistenz gegen Schadinsekten bewirken. So kann in Reis eine Resistenz gegen zwei der wichtigsten Reisschädlinge, den gestreiften Stengelbohrer (*Chilo suppressalis*) und den gelben Stengelbohrer (*Scirpophaga incertulas*), erzielt werden (Cheng X et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95(6):2767-2772; Nayak P et al. (1997) Proc Natl Acad Sci USA 94(6):2111-2116).

45. 5. Expression von Genen, die eine Akkumulation von Feinchemikalien, wie von Tocopherolen, Tocotrienolen oder Carotinoiden bewirken. Beispielhaft sei die Phytoendesaturase genannt. Bevorzugt sind Nukleinsäuren, die für die Phytoendesaturase aus *Narcissus pseudonarcissus* (GenBank Acc.-No.: X78815) oder funktionelle Äquivalente derselben kodieren.

6. Produktion von Neutraceuticals wie zum Beispiel polyungesättigten Fettsäuren wie beispielsweise Arachidonsäure oder EP (Eicosapentaensäure) oder DHA (Docosahexaensäure) durch Expression von Fettsäureelongasen und/oder -desaturasen oder Produktion von Proteinen mit verbessertem Nahrungswert wie zum Beispiel mit einem hohen Anteil an essentiellen Aminosäuren (z.B. das methioninreiche 2S Albumingen der Brasiinuss). Bevorzugt sind Nukleinsäuren, die für das methioninreiche 2S Albumin aus *Bertholletia excelsa* (GenBank Acc.-No.:AB044391), die $\Delta 6$ -Acyllipiddesaturase aus *Physcomitrella patens* (GenBank Acc.-No.: AJ222980; Girke et al. (1998) Plant J 15:39-48), die $\Delta 6$ -Desaturase aus *Mortierella alpina* (Sakuradani et al. (1999) Gene 238:445-453), die $\Delta 5$ -Desaturase aus *Caenorhabditis elegans* (Michaelson et al. 1998, FEBS Letters 439:215-218), die $\Delta 5$ -Fettsäuredesaturase (des-5) aus *Caenorhabditis elegans* (GenBank Acc.-No.: AF078796), die $\Delta 5$ -Desaturase aus *Mortierella alpina* (Michaelson et al. J Biol Chem 273:19055-19059), die $\Delta 6$ -Elongase aus *Caenorhabditis elegans* (Beaudoin et al. (2000) Proc Natl. Acad Sci USA 97:6421-6426), die $\Delta 6$ -Elongase aus *Physcomitrella patens* (Zank et al. (2000) Biochemical Society Transactions 28:654-657) oder funktionelle Äquivalente derselben kodieren.

10 7. Produktion von Feinchemikalien (wie beispielsweise Enzymen) und Pharmazeutika (wie zum Beispiel Antikörpern oder Vakzinen wie beschrieben bei Hood EE, Jilka JM. (1999) Curr Opin Biotechnol. 10(4):382-6; Ma JK, Vine ND (1999) Curr Top Microbiol Immunol 236:275-92). Beispielsweise konnte rekombinantes Avidin aus Hühnereiweiß und bakterieller β -Glucuronidase (GUS) in großen Maßstab in transgenen Maispflanzen produziert werden (Hood et al. (1999) Adv Exp Med Biol 464:127-47). Diese rekombinanten Proteine aus Maispflanzen werden von der Firma Sigma Chemicals Co. als hochreine Biochemikalien vertrieben.

15 8. Erreichen einer erhöhten Speicherfähigkeit in Zellen, die normalerweise weniger Speicherproteine oder -lipide enthalten mit dem Ziel, den Ertrag an diesen Substanzen zu erhöhen, zum Beispiel durch Expression einer Acetyl-CoA Carboxylase. Bevorzugt sind Nukleinsäuren, die für die Acetyl-CoA Carboxylase (Accase) aus *Medicago sativa* (GenBank Acc.-No.: L25042) oder funktionelle Äquivalente derselben kodieren.

Weitere Beispiele für vorteilhafte Gene sind zum Beispiel genannt bei Dunwell JM (2000) J Exp Bot. 51 Spec No:487-96.

30 40 Ferner können funktionelle Analoga der genannten Nukleinsäuren bzw. Proteine exprimiert werden. Funktionelle Analoga meint hier all die Sequenzen, die im wesentlichen die gleiche Funktion haben d.h. zu der Funktion (zum Beispiel einer Substratumszersetzung oder einer Signaltransduktion) befähigt sind wie auch das beispielhaft genannte Protein. Dabei kann das funktionelle Analogon sich in anderen Merkmalen durchaus unterscheiden. Es kann zum Beispiel eine höhere oder niedrigere Aktivität haben oder auch über weitere Funktionalitäten verfügen. Funktionelle Analoga meint ferner Sequenzen, die für Fusionsproteine bestehend aus einem der bevorzugten Proteine und anderen Proteinen zum Beispiel einem weiteren bevorzugten Protein oder aber auch einer Signalpeptidsequenz kodieren.

45

Die Expression der Nukleinsäuren unter Kontrolle der erfindungsgemäß Promotoren ist in jedem gewünschten Zellkompartiment, wie z.B. dem Endomembransystem, der Vakuole und den Chloroplasten möglich. Durch Nutzung des sekretorischen Weges 5 sind gewünschte Glykosylierungsreaktionen, besondere Faltungen u.ä. möglich. Auch die Sekretion des Zielproteins zur Zelloberfläche bzw. die Sezernierung ins Kulturmedium, beispielsweise bei Nutzung suspensionskultivierter Zellen oder Protoplasten ist möglich. Die dafür notwendigen Targetsequenzen können sowohl in einzelnen 10 Vektorvariationen berücksichtigt werden als auch durch Verwendung einer geeigneten Klonierungsstrategie gemeinsam mit dem zu klonierenden Zielgen in den Vektor mit eingebracht werden. Als Targetsequenzen können sowohl gen-eigene, sofern vorhanden, oder heterologe Sequenzen genutzt werden. Zusätzliche, heterologe zur 15 funktionellen Verknüpfung bevorzugte aber nicht darauf beschränkte Sequenzen sind weitere Targeting-Sequenzen zur Gewährleistung der subzellulären Lokalisation im Apoplasten, in der Vakuole, in Plastiden, im Mitochondrium, im endoplasmatischen 20 Retikulum (ER), im Zellkern, in Ölkörperchen oder anderen Kompartimenten; sowie Translationsverstärker wie die 5'-Leadersequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus (Gallie et al. (1987) Nucl Acids Res 15:8693-8711) und dergleichen. Das Verfahren, an sich nicht in den Plastiden lokalisierte Proteine, gezielt in die Plastiden zu transportieren, ist beschrieben (Klosgen RB & Weil JH (1991) Mol Gen Genet 225(2):297-304; Van Breusegem F et al. (1998) Plant Mol Biol 38(3):491-496). Bevorzugte Sequenzen sind

- a) kleine Untereinheit (SSU) der Ribulosebisphosphatcarboxylase (Rubisco ssu) aus Erbse, Mais, Sonnenblume
- 25 b) Transitpeptide abgeleitet von Genen der pflanzlichen Fettsäurebiosynthese wie das Transitpeptid des plastidären "Acyl Carrier Protein" (ACP), die Stearyl-ACP-Desaturase, β-Ketoacyl-ACP Synthase oder die Acyl-ACP-Thioesterase
- 30 c) das Transitpeptid für GBSSI ("Starch Granule Bound Starch Synthase I")
- d) LHCPII Gene.

35 Die Zielsequenzen können mit anderen, von dem Transitpeptid kodierenden Sequenzen verschiedenen, Targeting-Sequenzen verknüpft sein, um eine subzelluläre Lokalisation im Apoplasten, in der Vakuole, in Plastiden, im Mitochondrium, im Endoplasmatischen Retikulum (ER), im Zellkern, in Ölkörperchen oder anderen Kompartimenten zu gewährleisten. Ferner können Translationsverstärker wie die 5'-Leadersequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus (Gallie et al. (1987) Nucl Acids Res 15:8693-8711) und dergleichen zum Einsatz kommen.

40 Dem Fachmann ist ferner bekannt, dass er die oben beschriebenen Gene nicht direkt unter Verwendung der für diese Gene kodierenden Nukleinsäuresequenzen exprimieren oder zum Beispiel durch anti-sense reprimieren muss. Er kann auch zum Beispiel künstliche Transkriptionsfaktoren vom Typ der Zinkfingerproteine verwenden 45 (Beerli RR et al. (2000) Proc Natl Acad Sci USA 97(4):1495-500). Diese Faktoren lagern sich in den regulatorischen Bereichen der zu exprimierenden oder zu reprimierenden endogenen Gene an und bewirken, je nach Gestaltung des Faktors, eine Expression oder Repression des endogenen Gens. So kann man die gewünschten

20

Effekte auch durch Expression eines entsprechenden Zinkfinger-Transkriptionsfaktors unter Kontrolle eines der erfindungsgemäßen Promotoren erreichen.

Die erfindungsgemäßen Expressionskassetten können ebenso zur Unterdrückung bzw. 5 Reduktion von Replikation oder/und Translation von Zielgenen durch "Gene Silencing" eingesetzt werden.

Die erfindungsgemäßen Expressionskassetten können auch eingesetzt werden, um 10 Nukleinsäuren zu exprimieren, die sogenannte "antisense" Effekte vermitteln und so beispielsweise zur Verminderung der Expression eines Zielproteins befähigt sind.

Bevorzugte Gene bzw. Proteine, deren Suppression einen vorteilhaften Phänotyp bedingt, umfassen beispielhaft, aber nicht einschränkend:

15 a) Polygalakturonase zur Verhinderung von Zellabbau und "Matschig"-werden von Pflanzen und Früchten beispielsweise Tomaten. Bevorzugt werden dazu Nukleinsäuresequenzen wie die des Polygalakturonase-Gens der Tomate (GenBank Acc.-No.: X14074) oder dessen Homologe aus anderen Gattungen und Arten verwendet.

20 b) Verminderung der Expression von allergenen Proteinen wie beispielsweise beschrieben bei Tada Y et al. (1996) FEBS Lett 391(3):341-345 oder Nakamura R (1996) Biosci Biotechnol Biochem 60(8):1215-1221.

25 c) Veränderung der Blütenfarbe durch Suppression der Expression von Enzymen der Anthocyanbiosynthese. Entsprechende Vorgehensweisen sind beschrieben (beispielsweise bei Forkmann G, Martens S. (2001) Curr Opin Biotechnol 12(2):155-160). Bevorzugt werden dazu Nukleinsäuresequenzen wie die der Flavonoid-3'-hydroxylase (GenBank Acc.-No.: AB045593), der Dihydroflavanol-4-reduktase (GenBank Acc.-No.: AF017451), der Chalconisomerase (GenBank Acc.-No.: AF276302), der Chalconsynthase (GenBank Acc.-No.: AB061022), der Flavanone-3-beta-hydroxylase (GenBank Acc.-No.: X72592) oder der Flavone-synthase II (GenBank Acc.-No.: AB045592) oder deren Homologe aus anderen Gattungen und Arten verwendet.

35 d) Verschiebung des Amylose/Amylopektin gehaltes in Stärke durch Suppression des Verzweigungsenzyms Q, das für die α -1,6-glykosidische Verknüpfung verantwortlich ist. Entsprechende Vorgehensweisen sind beschrieben (beispielsweise bei Schwall GP et al. (2000) Nat Biotechnol 18(5):551-554). Bevorzugt werden dazu Nukleinsäuresequenzen wie die des Starch branching enzyme II der Kartoffel (GenBank Acc.-No.: AR123356; US 6,169,226) oder dessen Homologe aus anderen Gattungen und Arten verwendet.

45 Eine "antisense" Nukleinsäure meint zunächst eine Nukleinsäuresequenz die ganz oder teilweise zu zumindest einem Teil des "sense"-Stranges besagten Zielproteins komplementär ist. Dem Fachmann ist bekannt, dass er alternativ die cDNA oder das korrespondierendes Gen als Ausgangsmatrize für entsprechende antisense-Konstrukte verwenden kann. Bevorzugt ist die "antisense" Nukleinsäure komplementär zu dem kodierenden Bereich des Zielproteins oder einem Teil desselben. Die "antisense"

Nukleinsäure kann aber auch zu der nicht-kodierenden Region oder einem Teil der selben komplementär sein. Ausgehend von der Sequenzinformation zu einem Zielprotein, kann eine antisense Nukleinsäure unter Berücksichtigung der Basenpaarregeln von Watson und Crick in der dem Fachmann geläufigen Weise entworfen werden.

5 Eine antisense Nukleinsäure kann komplementär zu der gesamten oder einem Teil der Nukleinsäuresequenz eines Zielproteins sein. In einer bevorzugten Ausführungsform ist die antisense Nukleinsäure ein Oligonukleotid mit einer Länge von zum Beispiel 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 oder 50 Nukleotiden.

10 Die antisense Nukleinsäure umfasst in einer bevorzugten Ausführungsform α -anomere Nukleinsäuremoleküle. α -Anomere Nukleinsäuremoleküle bilden besondere doppelsträngige Hybride mit komplementärer RNA in denen im Unterschied zu den normalen β -Einheiten die Stränge parallel zu einander verlaufen (Gaultier et al. (1987) Nucleic Acids Res 15:6625-6641).

15 Ebenso umfasst ist die Verwendung der oben beschriebenen Sequenzen in sense-Orientierung, was wie dem Fachmann geläufig ist, zu einer Kosuppression führen kann. Die Expression von sense-RNA zu einem endogenen Gen kann dessen Expression vermindern oder ausschalten, ähnlich wie es für antisense Ansätze beschrieben wurde (Goring et al. (1991) Proc Natl Acad Sci USA 88:1770-1774; Smith et al. (1990) Mol Gen Genet 224:447-481; Napoli et al. (1990) Plant Cell 2:279-289; Van der Krol et al. (1990) Plant Cell 2:291-299). Dasselbe kann das eingeführte Konstrukt das zu vermindernde Gen ganz oder nur teilweise repräsentieren. Die Möglichkeit zur Translation ist nicht erforderlich.

20 25 Ganz besonders bevorzugt ist auch die Verwendung von Verfahren wie der Genregulation mittels doppelsträngiger RNA ("double-stranded RNA interference"). Entsprechende Verfahren sind dem Fachmann bekannt und im Detail beschrieben (z.B. Matzke MA et al. (2000) Plant Mol Biol 43:401-415; Fire A. et al (1998) Nature 391:806-811; WO 99/32619; WO 99/53050; WO 00/68374; WO 00/44914; WO 00/44895; WO 00/49035; WO 00/63364). Auf die in den angegebenen Zitaten beschriebenen Verfahren und Methoden wird ausdrücklich Bezug genommen. Hier wird durch gleichzeitige Einbringung von Strang- und Gegenstrang eine hocheffiziente Unterdrückung nativer Gene bewirkt.

30 35 40 45 50 55 Vorteilhaft kann die antisense-Strategie mit einem Ribozym-Verfahren gekoppelt werden. Ribozyme sind katalytisch aktive RNA Sequenzen, die gekoppelt an die antisense Sequenzen, die Zielsequenzen katalytisch spalten (Tanner NK. FEMS Microbiol Rev. 1999; 23 (3):257-75). Dies kann die Effizienz einer anti-sense Strategie erhöhen. Die Expression von Ribozymen zur Verminderung bestimmter Proteine ist dem Fachmann bekannt und beispielsweise beschrieben in EP-A1 0 291 533, EP-A1 0 321 201 und EP-A1 0 360 257. Geeignete Zielsequenzen und Ribozyme können zum Beispiel wie bei Steinecke (Ribozymes, Methods in Cell Biology 50, Galbraith et al. eds. Academic Press, Inc. (1995), 449-460) beschrieben, durch Sekundärstrukturberechnungen von Ribozym- und Ziel-RNA sowie durch deren Interaktion bestimmt werden (Bayley CC et al., Plant Mol Biol. 1992; 18(2):353-361; Lloyd AM and Davis RW et al., Mol Gen Genet. 1994 Mar;242(6):653-657). Beispielhaft sind "hammerhead"-Ribozyme zu nennen (Haselhoff and Gerlach (1988) Nature 334:585-591). Bevorzugte Ribozyme basieren auf Derivaten der Tetrahymena L-19

IVS RNA (US 4,987,071; US 5,116,742). Weitere Ribozyme mit Selektivität für eine L119 mRNA können selektiert werden (Bartel D und Szostak JW (1993) Science 261:1411-1418).

5 In einer weiteren Ausführungsform kann Verminderung der Zielprotein-Expression unter Verwendung von Nukleinsäuresequenzen bewirkt werden, die komplementär zu regulativen Elementen der Zielprotein-Gene sind, mit diesen eine triple-helikale Struktur ausbilden und so die Gen-Transkription verhindern (Helene C (1991) Anti-Cancer Drug Des. 6(6):569-84; Helene C et al. (1992) Ann NY Acad Sci 660:27-36; Maher LJ (1992) Bioassays 14(12):807-815).

10 Die erfindungsgemäßen bidirektionalen Promotoren sind besonders vorteilhaft, wenn er für die Regulation zweier Enzyme eines Stoffwechselweges eingesetzt wird. Beispielsweise kann die 2'-Methyl-6-phytylhydroquinon-methyltransferase und die Homogentisatphytylpyrophosphattransferase gleichzeitig über einen der erfindungsgemäßen 15 bidirektionalen Promoter exprimiert werden, was einen Anstieg von Tocopherolen bewirkt. Weiterhin führt die Hemmung der Homogentisatdioxxygenase (beispielsweise über die Expression einer korrespondierenden dsRNA) und die Überexpression der Tyrosinaminotransferase zu einer Steigerung des Tocopherolgehaltes. Im Carotinoid-20 Stoffwechsel führt die Hemmung der ϵ -Zyklase und die Überexpression der β -Zyklase zu einer Veränderung des Gehaltes von α -Carotin und β -Carotin.

25 Es ist möglich postranskriptionellen „Silencing“-Effekte durch parallele Hemmung der Transkription des SDE3 Gens und Überexpression des rekombinanten Proteins zu verhindern (WO 02/063039).

30 Auch immunologisch aktive Teile von Antikörpern können unter Verwendung der erfindungsgemäßen Promotoren vorteilhaft exprimiert werden. So kann beispielsweise in die eine Richtung die schwere Kette eines IgG1 Antikörpers und in die andere Richtung die leichte Kette exprimiert werden. Nach Translation bilden beide einen 35 funktionellen Antikörper (WO 02/101006).

40 Weiterhin können gleichzeitig stressbezogene Ionentransporter (WO 03/057899) zusammen mit Herbizidgenen exprimiert werden, um die Toleranz gegen Umwelt-einflüsse zu erhöhen.

45 Viele Enzyme bestehen aus zwei oder mehreren Untereinheiten, die beide notwendig für die Funktion sind. Mittels eines der erfindungsgemäßen, bidirektionalen Promotoren ist es möglich, zwei Untereinheiten gleichzeitig zu exprimieren. Ein Beispiel dafür ist die Überexpression der α - und der β -Untereinheit des Follikel stimulierendes menschlichen Hormons.

50 Für die Etablierung von Transformationssystemen ist ein Konstrukt bestehend aus einem Gen für eine Selektionsmarker und einem Reportergen besonders wertvoll, wenn sie durch diesen bidirektionalen Promotor reguliert werden.

55 Die erfindungsgemäßen Expressionskassetten und die von ihnen abgeleiteten Vektoren können weitere Funktionselemente enthalten. Der Begriff Funktionselement ist breit zu verstehen und meint all solche Elemente, die einen Einfluss auf Herstellung,

Vermehrung oder Funktion der erfindungsgemäßen Expressionskassetten oder von diesen abgeleitete Vektoren oder Organismen haben. Beispielhaft aber nicht einschränkend seien zu nennen:

5 a) Reportergene

Reportergene oder -proteine kodieren für leicht quantifizierbare Proteine und gewährleisten über Eigenfarbe oder Enzymaktivität eine Bewertung der Transformationseffizienz, des Expressionsortes oder -zeitpunktes (Schenborn E, Groskreutz D (1999) Mol Biotechnol 13(1):29-44). Beispielhaft sind zu nennen:

10

- "green fluorescence protein" (GFP) (Chui WL et al., Curr Biol 1996, 6:325-330; Leffel SM et al., Biotechniques. 23(5):912-8, 1997; Sheen et al.(1995) Plant Journal 8(5):777-784; Haseloff et al.(1997) Proc Natl Acad Sci USA 94(6):2122-2127; Reichel et al.(1996) Proc Natl Acad Sci USA 93(12):5888-5893; Tian et al. (1997) Plant Cell Rep 16:267-271; WO 97/41228).

15

- Chloramphenicoltransferase (Fromm et al. (1985) Proc Natl Acad Sci USA 82:5824-5828),

20

- Luziferase (Millar et al. (1992) Plant Mol Biol Rep 10:324-414; Ow et al. (1986) Science, 234:856-859); erlaubt Biolumineszenzdetektion.

25

- β -Galactosidase, kodiert für ein Enzym für das verschiedenen chromogene Substrate zur Verfügung stehen.

30

- β -Glucuronidase (GUS) (Jefferson et al. (1987) EMBO J 6:3901-3907) oder das uidA Gen, das ein Enzym für verschiedene chromogene Substrate kodiert.

35

- R-Locus Genprodukt:Protein, das die Produktion von Anthocyaninpigmenten (rote Färbung) in pflanzlichen Gewebe reguliert und so eine direkte Analyse der Promotoraktivität ohne Zugabe zusätzlicher Hilfsstoffe oder chromogener Substrate ermöglicht (Dellaporta et al., In: Chromosome Structure and Function: Impact of New Concepts, 18th Stadler Genetics Symposium 11:263-282, 1988).

40

- β -Lactamase (Sutcliffe (1978) Proc Natl Acad Sci USA 75:3737-3741), Enzym für verschiedene chromogene Substrate (z.B. PADAC, ein chromogenes Cephalosporin).

45

- xylE Genprodukt (Zukowsky et al. (1983) Proc Natl Acad Sci USA 80:1101-1105), Catecholdioxygenase, die chromogene Catechol umsetzen kann.
- Alpha-Amylase (Ikuta et al. (1990) Bio/Technol. 8:241-242).
- Tyrosinase (Katz et al.(1983) J Gen Microbiol 129:2703-2714), Enzym, das Tyrosin zu DOPA und Dopaquinon oxidiert, die infolge das leicht nachweisbare Melanin bilden.

5 - Aequorin (Prasher et al.(1985) Biochem Biophys Res Commun 126(3):1259-1268), kann in der Calcium-sensitiven Biolumineszenzdetektion verwendet werden.

10 5 b) Replikationsursprünge, die eine Vermehrung der erfindungsgemäßen Expressionskassetten oder Vektoren in zum Beispiel *E. coli* gewährleisten. Beispielhaft seien genannt ORI (origin of DNA replication), der pBR322 ori oder der P15A ori (Sambrook et al.: Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

15 10 c) Elemente zum Beispiel "Bordersequenzen", die einen Agrobakterien-vermittelten Transfer in Pflanzenzellen für die Übertragung und Integration ins Pflanzen-Genom ermöglichen, wie zum Beispiel die rechte oder linke Begrenzung der T-DNA oder die vir-Region.

20 15 d) Multiple Klonierungsregionen (MCS) erlauben und erleichtern die Insertion eines oder mehrerer Nukleinsäuresequenzen.

25 20 Dem Fachmann sind verschiedene Wege bekannt, um zu einer erfindungsgemäßen Expressionskassette zu gelangen. Die Herstellung einer erfindungsgemäßen Expressionskassette erfolgt beispielsweise durch Fusion eines der erfindungsgemäßen Promotoren (oder eines funktionellen Äquivalents oder funktionell äquivalenten Teils gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2 oder eines funktionellen Äquivalents mit einer zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz, gegebenenfalls einer für eine Transitpeptid kodierenden Sequenz, vorzugsweise ein chloroplastenspezifisches Transitpeptid, welches vorzugsweise zwischen dem Promotor und der jeweiligen Nukleinsäuresequenz angeordnet ist, sowie einem Terminator- oder Polyadenylierungssignal. Dazu verwendet man gängige Rekombinations- und Klonierungstechniken (wie oben beschrieben).

30 25 Unter einer Expressionskassette sind aber auch solche Konstruktionen zu verstehen, bei denen der Promotor, ohne dass er zuvor mit einer zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz funktionell verknüpft wurde, zum Beispiel über eine gezielte homologe Rekombination oder eine zufällige Insertion in ein Wirtsgenom eingeführt wird, dort regulatorische Kontrolle über mit ihm dann funktionell verknüpfte Nukleinsäuresequenzen übernimmt und die transgene Expression derselben steuert. Durch Insertion des Promotors - zum Beispiel durch eine homologe Rekombination - vor eine für ein bestimmtes Polypeptid kodierende Nukleinsäure erhält man eine erfindungsgemäße Expressionskassette, welche die Expression des bestimmten Polypeptides in der Pflanze steuert. Ferner kann die Insertion des Promotors auch derart erfolgen, dass antisense-RNA zu der für ein bestimmtes Polypeptid kodierenden Nukleinsäure exprimiert wird. Damit wird die Expression des bestimmten Polypeptides in Pflanzen herunterreguliert oder ausgeschaltet.

35 40 45 Analog kann auch eine transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz zum Beispiel durch eine homologe Rekombination hinter den endogenen, natürlichen Promotor platziert werden, wodurch man eine erfindungsgemäße Expressionskassette erhält, welche die Expression der transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz steuert.

Erfindungsgemäß sind ferner Vektoren, die die oben beschriebenen Expressionskassetten enthalten. Vektoren können beispielhaft Plasmide, Cosmide, Phagen, Viren oder auch Agrobakterien sein.

5

Ein anderer Gegenstand der Erfindung betrifft transgene Organismen, transformiert mit wenigstens einer erfindungsgemäßen Expressionskassette oder einem erfindungsgemäßen Vektor, sowie Zellen, Zellkulturen, Gewebe, Teile - wie zum Beispiel bei pflanzlichen Organismen Blätter, Wurzeln usw. - oder Vermehrungsgut abgeleitet von solchen Organismen.

10

Unter Organismus, Ausgangs- oder Wirtsorganismen werden prokaryotische oder eukaryotische Organismen, wie beispielsweise Mikroorganismen oder pflanzliche Organismen verstanden. Bevorzugte Mikroorganismen sind Bakterien, Hefen, Algen oder Pilze.

15

Bevorzugte Bakterien sind Bakterien der Gattung *Escherichia*, *Erwinia*, *Agrobacterium*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes* oder *Cyanobakterien* zum Beispiel der Gattung *Synechocystis*. Bevorzugt sind vor allem Mikroorganismen, welche zur Infektion von Pflanzen und damit zur Übertragung der erfindungsgemäßen Kassetten befähigt sind. Bevorzugte Mikroorganismen sind solche aus der Gattung *Agrobacterium* und insbesondere der Art *Agrobacterium tumefaciens*.

20

25

Bevorzugte Hefen sind *Candida*, *Saccharomyces*, *Hansenula* oder *Pichia*. Bevorzugte Pilze sind *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Ashbya*, *Neurospora*, *Fusarium*, *Beauveria* oder weitere in Indian Chem Engr. Section B. Vol 37, No 1,2 (1995) auf Seite 15, Tabelle 6 beschriebene Pilze.

30

35

Als transgene Organismen bevorzugte Wirts- oder Ausgangsorganismen sind vor allem Pflanzen. Eingeschlossen sind im Rahmen der Erfindung alle Gattungen und Arten höherer und niedrigerer Pflanzen des Pflanzenreiches. Eingeschlossen sind ferner die reifen Pflanzen, Saatgut, Sprossen und Keimlinge, sowie davon abgeleitete Teile, Vermehrungsgut und Kulturen, zum Beispiel Zellkulturen. Reife Pflanzen meint Pflanzen zu jedem beliebigen Entwicklungsstadium jenseits des Keimlings. Keimling meint eine junge, unreife Pflanze in einem frühen Entwicklungsstadium.

40

45

Einjährige, mehrjährige, monocotyledone und dicotyledone Pflanzen sind bevorzugte Wirtsorganismen für die Herstellung transgener Pflanzen. Bevorzugt sind Pflanzen nachfolgender Pflanzenfamilien: *Amaranthaceae*, *Asteraceae*, *Brassicaceae*, *Carophyllaceae*, *Chenopodiaceae*, *Compositae*, *Cruciferae*, *Cucurbitaceae*, *Labiatae*, *Leguminosae*, *Papilionoideae*, *Liliaceae*, *Linaceae*, *Malvaceae*, *Rosaceae*, *Rubiaceae*, *Saxifragaceae*, *Scrophulariaceae*, *Solanaceae*, *Sterculiaceae*, *Tetragoniacea*, *Theaceae*, *Umbelliferae*.

Bevorzugte monokotyle Pflanzen sind insbesondere ausgewählt aus den monokotylen Kulturpflanzen, wie zum Beispiel der Familie der Gramineae wie Reis, Mais, Weizen oder andere Getreidearten wie Gerste, Hirse, Roggen, Triticale oder Hafer sowie dem Zuckerrohr sowie alle Arten von Gräsern.

Bevorzugte dikotyle Pflanzen sind insbesondere ausgewählt aus den dikotylen Kulturpflanzen, wie zum Beispiel

- Asteraceae wie Sonnenblume, Tagetes oder Calendula und andere mehr,

5

- Compositae, besonders die Gattung Lactuca, ganz besonders die Art sativa (Salat) und andere mehr,

10

- Cruciferae, besonders die Gattung Brassica, ganz besonders die Arten napus (Raps), campestris (Rübe), oleracea cv Tastie (Kohl), oleracea cv Snowball Y (Blumenkohl) und oleracea cv Emperor (Broccoli) und weitere Kohlarten; und der Gattung Arabidopsis, ganz besonders die Art thaliana und andere mehr,

15

- Cucurbitaceae wie Melone, Kürbis oder Zucchini und andere mehr,

15

- Leguminosae besonders die Gattung Glycine, ganz besonders die Art max (Sojabohne) Soja sowie Alfalfa, Erbse, Bohnengewächsen oder Erdnuss und andere mehr

20

- Rubiaceae, bevorzugt der Unterklasse Lamiidae wie beispielsweise Coffea arabica oder Coffea liberica (Kaffestrauch) und andere mehr,

25

- Solanaceae besonders die Gattung Lycopersicon, ganz besonders die Art esculentum (Tomate) und die Gattung Solanum, ganz besonders die Art tuberosum (Kartoffel) und melongena (Aubergine) sowie Tabak oder Paprika und andere mehr,

30

- Sterculiaceae, bevorzugt der Unterklasse Dilleniidae wie beispielsweise Theobroma cacao (Kakastrauch) und andere mehr,

35

- Theaceae, bevorzugt der Unterklasse Dilleniidae wie beispielsweise Camellia sinensis oder Thea sinensis (Teestrauch) und andere mehr,

40

- Umbelliferae, besonders die Gattung Daucus (ganz besonders die Art carota (Karotte) und Apium (ganz besonders die Art graveolens dulce (Selarie) und andere mehr; und die Gattung Capsicum, ganz besonders die Art annum (Pfeffer) und andere mehr,

sowie Lein, Soja, Baumwolle, Hanf (Flachs), Gurke, Spinat, Möhre, Zuckerrübe und den verschiedenen Baum-, Nuss- und Weinarten, insbesondere Banane und Kiwi.

45

Bevorzugt sind Nicotiana tabacum, Tagetes erecta und Calendula officinalis sowie alle Gattungen und Arten, die als Nahrungs- oder Futtermittel zum Einsatz kommen, wie die beschriebenen Getreidearten, oder sich zur Herstellung von Ölen eignen, wie Ölsaaten (wie Raps), Nussarten, Soja, Sonnenblume, Kürbis und Erdnuss.

45

Am meisten bevorzugt sind alle Pflanzen der Familie der Brassicaceae, ganz besonders die Brassica Arten wie Brassica napus (Raps), campestris (Rübe), oleracea cv Tastie (Kohl), oleracea cv Snowball Y (Blumenkohl) und oleracea cv Emperor

(Broccoll) und weitere Kohlarten; sowie der Gattung *Arabidopsis*, ganz besonders die Art *thaliana*.

5 Pflanzliche Organismen im Sinne der Erfindung sind weiterhin weitere photosynthetisch aktive befähigte Organismen, wie zum Beispiel Algen oder Cyanobakterien, sowie Moose. Bevorzugte Algen sind Grünalgen, wie beispielsweise Algen der Gattung *Haematococcus*, *Phaedactylum tricornatum*, *Volvox* oder *Dunaliella*. Insbesondere bevorzugt sind, Algen wie *Chlorophyceae*, *Phaeophyceae*, *Rhodophyceae*, *Myxophyceae*, *Xanthophyceae*, *Bacillariophyceae* (Diatomeen) und *Euglenophyceae*.

10 10 Die Herstellung eines transformierten Organismus oder einer transformierten Zelle erfordert, dass die entsprechende DNA in die entsprechende Wirtszelle eingebracht wird. Für diesen Vorgang, der als Transformation bezeichnet wird, steht eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung (siehe auch Keown et al. (1990) *Methods in Enzymology* 185:527-537). So kann die DNA beispielhaft direkt durch Mikroinjektion oder durch Bombardierung mit DNA-beschichteten Mikropartikeln eingeführt werden. Auch kann die Zelle chemisch, zum Beispiel mit Polyethylenglycol, permeabilisiert werden, so dass die DNA durch Diffusion in die Zelle gelangen kann. Die DNA kann auch durch Protoplastenfusion mit anderen DNA-enthaltenden Einheiten wie Minicells, Zellen, Lysosomen oder Liposomen erfolgen. Elektroporation ist eine weitere geeignete Methode zur Einführung von DNA, bei der die Zellen reversibel durch einen elektrischen Impuls permeabilisiert werden.

15 15 20 25 30 Bei Pflanzen werden dabei die beschriebenen Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt. Geeignete Methoden sind vor allem die Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone, die sogenannte particle bombardment Methode, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung und die Mikroinjektion.

35 35 Neben diesen "direkten" Transformationstechniken kann eine Transformation auch durch bakterielle Infektion mittels *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* durchgeführt werden. Diese Stämme enthalten ein Plasmid (Ti bzw. Rl Plasmid), das auf die Pflanze nach *Agrobacterium*-Infektion übertragen wird. Ein Teil dieses Plasmids, genannt T-DNA (transferred DNA), wird in das Genom der Pflanzenzelle integriert.

40 40 Die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation ist am besten für dicotyledone, diploide Pflanzenzellen geeignet, wohingegen die direkten Transformationstechniken sich für jeden Zelltyp eignen.

45 45 Die Einführung einer erfindungsgemäßen Expressionskassette in Zellen, bevorzugt in pflanzliche Zellen, kann vorteilhaft unter Verwendung von Vektoren realisiert werden.

In einer vorteilhaften Ausführungsform wird die Einführung der Expressionskassette mittels Plasmidvektoren realisiert. Bevorzugt sind solche Vektoren, die eine stabile Integration der Expressionskassette in das Wirtsgenom ermöglichen.

Im Falle von Injektion oder Elektroporation von DNA in pflanzliche Zellen sind keine besonderen Anforderungen an das verwendete Plasmid gestellt. Einfache Plasmide wie die der pUC-Reihe können verwendet werden. Sollen vollständige Pflanzen aus den transformierten Zellen regeneriert werden, so ist es erforderlich, dass sich auf dem Plasmid ein zusätzliches selektionierbares Markergen befindet.

5 Transformationstechniken sind für verschiedene monokotyle und dikotyle pflanzliche Organismen beschrieben. Ferner stehen verschiedene mögliche Plasmidvektoren für die Einführung fremder Gene in Pflanzen zur Verfügung, die in der Regel einen 10 Replikationsursprung für eine Vermehrung in E.coli und ein Markergen für eine Selektion transformierter Bakterien enthalten. Beispiele sind pBR322, pUC Reihe, M13mp Reihe, pACYC184 etc.

15 Die Expressionskassette kann in den Vektor über eine geeignete Restriktionsschnittstelle eingeführt werden. Das entstandene Plasmid wird zunächst in E.coli eingeführt. Korrekt transformierte E.coli werden selektioniert, gezüchtet und das rekombinante Plasmid mit dem Fachmann geläufigen Methoden gewonnen. Restriktionsanalyse und Sequenzierung können dazu dienen, den Klonierungsschritt zu überprüfen.

20 Transformierte Zellen d.h. solche, welche die eingeführte DNA integriert in die DNA der Wirtszelle enthalten, können von untransformierten selektioniert werden, wenn ein selektionierbarer Marker Bestandteil der eingeführten DNA ist. Als Marker kann beispielhaft jedes Gen fungieren, dass eine Resistenz gegen Antibiotika oder Herbizide zu verleihen vermag. Transformierte Zellen, die ein solches Markergen exprimieren, 25 sind in der Lage, in der Gegenwart von Konzentrationen eines entsprechenden Antibiotikums oder Herbicides zu überleben, die einen untransformierten Wildtyp abtöten. Beispiel sind das bar Gen, dass Resistenz gegen das Herbizid Phosphinothricin verleiht (Rathore KS et al., Plant Mol Biol. 1993 Mar;21(5):871-884), das nptII Gen, dass Resistenz gegen Kanamycin verleiht, das hpt Gen, das Resistenz gegen 30 Hygromycin verleiht, oder das EPSP-Gen, das Resistenz gegen das Herbizid Glyfosat verleiht.

35 Je nach Methode der DNA-Einführung können weitere Gene auf dem Vektorplasmid erforderlich sein. Werden Agrobacteria verwendet, so ist die Expressionskassette in spezielle Plasmide zu integrieren, entweder in einen Zwischenvektor (englisch: shuttle or intermediate vector) oder einen binären Vektor. Wenn zum Beispiel ein Ti oder Ri Plasmid zur Transformation verwendet werden soll, ist zumindest die rechte Begrenzung, meistens jedoch die rechte und die linke Begrenzung der Ti oder Ri Plasmid T-DNA als flankierende Region mit der einzuführenden Expressions- 40 kassette verbunden. Bevorzugt werden binäre Vektoren verwendet. Binäre Vektoren können sowohl in E.coli als auch in Agrobacterium replizieren. Sie enthalten in der Regel ein Selektionsmarkergen und einen Linker oder Polylinker flankiert von der rechten und linken T-DNA Begrenzungssequenz. Sie können direkt in Agrobacterium transformiert werden (Holsters et al. (1978) Mol. Gen. Genet. 163:181-187). Das 45 Selektionsmarkergen erlaubt eine Selektion transformierter Agrobacteria und ist zum Beispiel das nptII Gen, das eine Resistenz gegen Kanamycin verleiht. Das in diesem Fall als Wirtsorganismus fungierende Agrobacterium sollte bereits ein Plasmid mit der vir-Region enthalten. Diese ist für die Übertragung der T-DNA auf die pflanzliche Zelle

erforderlich. Ein so transformiertes Agrobacterium kann zur Transformation pflanzlicher Zellen verwendet werden.

5 Die Verwendung von T-DNA zur Transformation pflanzlicher Zellen ist intensiv untersucht und beschrieben (EP 120516; Hoekema, In: The Binary Plant Vector System, Offsetdrukkerij Kanters B.V., Alblaserdam, Chapter V; Fraley et al. (1986) CRC Crit. Rev. Plant. Sci., 4:1-46 and An et al. (1985) EMBO J. 4:277-287). Verschiedene binäre Vektoren sind bekannt und teilweise kommerziell erhältlich wie zum Beispiel pBIN19 (Clontech Laboratories, Inc. U.S.A.).

10 Für den Transfer der DNA in die pflanzliche Zelle werden pflanzliche Explantate mit Agrobacterium tumefaciens oder Agrobacterium rhizogenes kokultiviert. Ausgehend von infiziertem Pflanzenmaterial (z.B. Blatt-, Wurzel- oder Stengelteile, aber auch Protoplasten oder Suspensionen von Pflanzenzellen) können ganze Pflanzen unter 15 Verwendung eines geeigneten Mediums, dass zum Beispiel Antibiotika oder Biozide zur Selektion transformierter Zellen enthalten kann, regeneriert werden. Die erhaltenen Pflanzen können dann auf die Präsenz der eingeführten DNA, hier der erfundungsgemäßen Expressionskassette, durchmustert werden. Sobald die DNA in das Wirts- 20 genom integriert ist, ist der entsprechende Genotyp in der Regel stabil und die entsprechende Insertion wird auch in den Nachfolgegenerationen wiedergefunden. In der Regel enthält die integrierte Expressionskassette einen Selektionsmarker (s.o.). Der Selektionsmarker erlaubt die Selektion von transformierten Zellen von untransformierten (McCormick et al. (1986) Plant Cell Rep 5:81-84). Die erhaltenen Pflanzen 25 können in üblicher Weise gezüchtet und gekreuzt werden. Zwei oder mehr Generationen sollten kultiviert werden, um sicherzustellen, dass die genomische Integration stabil und vererblich ist.

30 Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von Kung SD & Wu R, Academic Press (1993), S.128 - 143 sowie in Potrykus I (1991) Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 42:205-225) beschrieben. Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, Agro_bakterium tumefaciens zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al. 35 (1984) Nucl Acids Res 12:8711f.).

35 Sobald eine transformierte Pflanzenzelle hergestellt wurde, kann eine vollständige Pflanze unter Verwendung von dem Fachmann bekannten Verfahren erhalten werden. Hierbei geht man beispielhaft von Kalluskulturen aus. Aus diesen noch undifferenzierten Zellmassen kann die Bildung von Spross und Wurzel in bekannter Weise induziert 40 werden. Die erhaltenen Sprösslinge können ausgepflanzt und gezüchtet werden.

45 Die Wirksamkeit der Expression der transgen exprimierten Nukleinsäuren kann beispielsweise *in vitro* durch Sprossmeristemvermehrung unter Verwendung einer der oben beschriebenen Selektionsmethoden ermittelt werden.

Erfindungsgemäß sind ferner von den oben beschriebenen transgenen Organismen abgeleitete Zellen, Zellkulturen, Teile – wie zum Beispiel bei transgenen pflanzlichen Organismen Wurzeln, Blätter etc.-, und transgenes Vermehrungsgut wie Saaten oder Früchte.

Von Menschen und Tieren verzehrbarer erfindungsgemäß, genetisch veränderte Pflanzen können auch beispielsweise direkt oder nach an sich bekannter Aufbereitung als Nahrungsmittel oder Futtermittel verwendet werden.

5 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung der oben beschriebenen erfindungsgemäß, transgenen Organismen und der von ihnen abgeleitete Zellen, Zellkulturen, Teile – wie zum Beispiel bei transgenen pflanzlichen Organismen Wurzeln, Blätter etc.- , und transgenes Vermehrungsgut wie Saaten oder Früchte, zur Herstellung von Nahrungs- oder Futtermitteln, Pharmazeutika oder Feinchemikalien.

10

Bevorzugt ist ferner ein Verfahren zur rekombinanten Herstellung von Pharmazeutika oder Feinchemikalien in Wirtsorganismen wobei ein Wirtsorganismus mit einer der oben beschriebenen Expressionskassetten oder Vektoren transformiert wird und diese Expressionskassette ein oder mehrere Strukturgene enthält, die für die gewünschte Feinchemikalle kodieren oder die Biosynthese der gewünschten Feinchemikalle katalysieren, der transformierte Wirtsorganismus gezüchtet wird und die gewünschte Feinchemikalle aus dem Züchtungsmedium isoliert wird. Dieses Verfahren ist für Feinchemikalien wie Enzyme, Vitamine, Aminosäuren, Zucker, Fettsäuren, natürliche

15 und synthetische Geschmacks-, Aroma- und Farbstoffe breit anwendbar. Besonders bevorzugt ist die Produktion von Tocopherolen und Tocotrienolen sowie Carotinoiden. Die Züchtung der transformierten Wirtsorganismen sowie die Isolierung aus den Wirtsorganismen bzw. aus dem Züchtungsmedium erfolgt mittels der dem Fachmann bekannten Verfahren. Die Produktion von Pharmazeutika, wie zum Beispiel Antikörpern oder Vakkzinen ist beschrieben bei Hood EE, Jilka JM (1999). Curr Opin Biotechnol 10(4):382-6; Ma JK, Vine ND (1999) .Curr Top Microbiol Immunol 236:275-92.

20

25

Sequenzen

1. SEQ ID NO: 1 Bidirektionaler Promotor aus *Arabidopsis thaliana*. Intergenische Region zwischen dem putativen FD-Gen und dem putativen OASTL Gen bis jeweils vor die angenommenen Transkriptionsstarts.

5

2. SEQ ID NO: 2 Bidirektionaler Promotor aus *Arabidopsis thaliana* einschließlich der 5'-untranslatierten Regionen des putativen FD-Gen und des putativen OASTL Gen bis jeweils vor die ATG-Start-Codons. Im Vergleich zu der nativen Sequenz umfasst vorliegende Sequenz ein zusätzliches C an Position 4 gegenüber der nativen *Arabidopsis*-sequenz durch die Einführung einer BamHI Erkennungssequenz.

10

15 3. SEQ ID NO: 3 Sequenz des Plasmids pUH200. Das GUS Gen wird in Richtung des FD Gens exprimiert, das nptII-Gen in Richtung des OASTL Gens.

20 4. SEQ ID NO: 4 Sequenz des Plasmids pUH201. Das GUS Gen wird in Richtung des OASTL Gens exprimiert, das nptII-Gen in Richtung des FD Gens.

25 5. SEQ ID NO: 5 Oligonukleotid-Primer pFD3
5'-acggatccgagagacagagacggagacaaaa-3'

6. SEQ ID NO: 6 Oligonukleotid-Primer pFD4 5'-gcggatccaagcttcaactgcttaattc-3'

30 Beschreibung der Abbildungen

Fig. 1: Schematische Darstellung der bidirektionalen Einheit in den Vektoren UH200 und UH201. RB: Rechte Grenze („Border“) der *Agrobacterium* T-DNA; CATpA: Terminators des Cathepsin D Inhibitor; nptII: Neomycinphosphotransferase II Gen (Kanamycin-Resistenz-Gen); FD: Intergenische Region zwischen FD und OASTL Gen (+/- geben die Leserichtung des FD-Gens an); GUS: β -Glucuronidase-Gen; 35SpA: Terminator des 35S CaMV Gens; LB: Linke Grenze („Border“) der *Agrobacterium* T-DNA.

35

40 Fig. 2: Analyse der GUS Aktivität in Blättern transgener Rapspflanzen transformiert mit UH 200 (Orientierung des Ferredoxingens) bzw. UH 201 (Orientierung des OASTL Gens) im Vergleich zu Wildtyp (WT) Pflanzen. Gezeigt sind die Ergebnisse verschiedener Linien von UH200 bzw UH201 transformierter Raps-Pflanzen (gekennzeichnet durch Nummer der jeweiligen Linie auf der x-Achse). Die GUS-Aktivität ist pMol Methylumbelliferon (MU) / mg (Protein) min angegeben.

45

Beispiele**Allgemeine Methoden:**

5 Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamidtmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeführten Klonierungsschritte wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agaroseelektrophoresen, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylonmembranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von *E. coli* Zellen, Anzucht von Bakterien, Vermehrung von Phagen und Sequenzanalyse rekombinanter DNA werden wie bei Sambrook et al. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press; ISBN 0-87969-309-6 beschrieben durchgeführt. Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgt mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma ABI nach der Methode von Sanger (Sanger et al. (1977) Proc Natl Acad Sci USA 74:5463-5467).

Beispiel 1: Isolierung von genomischer DNA aus *Arabidopsis thaliana*, Tabak und Raps

20 Die genomische DNA aus *Arabidopsis thaliana*, Tabak und Raps wurde mithilfe des DNeasy Plant Mini Kit von Qiagen Kat. No. 60106 entsprechend der Vorschrift isoliert.

Beispiel 2: Transformation von Tabak und Raps

25 Die Transformation von Tabak erfolgte über Infektion mit *Agrobacterium tumefaciens* gemäß der von Horsch entwickelten Methode (Horsch et al. (1985) Science 227: 1229-1231). Alle zur Transformation verwendeten Konstrukte wurden anhand der Gefrier-/Tau-Methode (wiederholtes Auftauen und Einfrieren) in *Agrobacterium tumefaciens* transformiert. Die das gewünschte Konstrukt enthaltenden *Agrobacterium*-Kolonien wurden auf YEB Medium (1% Rinderextrakt (Difco), 0,5% Caseinenzym-hydrolysat, 0,1% Hefeextrakt(Duchefa), 0,5% Saccharose, 2 mM MgSO₄, 1,5% Agar) -Medium mit 50 µg/ml Kanamycin, 40 µg/ml Gentamycin, 100 µg/ml Spectinomycin und 25 µg/ml Rifampicin selektiert.

35 Zur Transformation von Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun NN) wurden 10 ml einer unter Selektion gewachsenen Übernachtkultur von *Agrobacterium tumefaciens* abzentrifugiert, der Überstand verworfen, und die Bakterien im gleichen Volumen Antibiotika-freien Mediums resuspendiert. In einer sterilen Petrischale wurden 40 Blattscheiben steriler Pflanzen (Durchmesser ca. 1 cm) in dieser Bakterienlösung gebadet. Anschließend wurden die Blattscheiben in Petrischalen auf MS-Medium (Murashige und Skoog (1962) Physiol Plant 15:473ff.) mit 2% Saccharose und 0,8% Bacto-Agar ausgelegt. Nach 2-tägiger Inkubation im Dunkeln bei 25°C wurden sie auf MS-Medium mit 100 mg/l Kanamycin, 500 mg/l Claforan, 1 mg/l Benzylaminopurin (BAP), 0,2 mg/l Naphtylessigsäure (NAA), 1,6% Glukose und 0,8% Bacto-Agar übertragen und die Kultivierung (16 Stunden Licht / 8 Stunden Dunkelheit) fortgesetzt. Wachsende Sprosse wurden auf hormonfreies MS-Medium mit 2% Saccharose, 250 mg/l Claforan und 0,8% Bacto-Agar überführt.

33

Die Transformation von Raps erfolgte mittels der Petiolentransformation nach Moloney et al. (Moloney MM et al. (1989) Plant Cell Rep 8:238-242).

5 Beispiel 3: Untersuchung zur bidirektionalen Expression des FD Promoters

5 a) PCR Isolierung des FD Promoters aus *Arabidopsis thaliana*

Der putative bidirektionale Promoter wurde mittels PCR aus genomicscher *Arabidopsis thaliana* DNA mit den Primern FD3 und FD4 amplifiziert. Dem Primer FD3 wurden die mit Fettdruck hervorgehobenen Nukleotide für einen BamHI Ort angefügt. Durch Insertion eines C (Fett) wurde im Unterschied zur genomicschen Sequenz ein BamHI Ort im Primer FD4 eingeführt.

10 Primer FD3: (SEQ ID NO: 5)

15 5'-acggatccgagagacagagagacggagacaaaa-3'

15 Primer FD4: (SEQ ID NO: 6)

5'-gcggatccaagcttcactgcttaattc-3'

20 Reaktionsansatz:

1 μl DNA

37 μl H₂O

25 5 μl 10x Puffer

1 μl FD3 Primer 10 μM

1 μl FD4 Primer 10 μM

4 μl dNTP 2,5 mM

1 μl Pfu Turbo- DNA Polymerase (Stratagene)

30 PCR-Bedingungen:

1 Zyklus mit 5 min. bei 95°C

25 Zyklen mit, 52°C für 1 min, 72°C für 1 min. und 95°C für 30 sec

1 Zyklus mit 72°C für 10 min.,

35 anschließend Kühlung auf 4°C bis zur Weiterverarbeitung.

35 b) Konstruktion der FD:GUS Expressionskassetten

40 Das den FD Promoter enthaltende PCR-Produkt wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI gespalten und in den Vektor pGUSINT37 (SunGene), ebenfalls BamHI gespalten, ligiert. Aus der ungerichteten Klonierung entstanden die beiden Plasmide pFD+GUS und pFD-GUS, in denen das Promoterfragment in jeweils entgegengesetzten Orientierungen vor dem GUS Gen platziert ist. Das Plasmid pFD+GUS enthält den Promoter in der Transkriptionsrichtung des putativen Ferredoxin-Gens, das Plasmid pFD-GUS in der Orientierung des annotierten O-Acetylserin-thiolyase Gens (OASTL, Cystein Synthase).

Beispiel 4: Herstellung von Vektoren zur gleichzeitigen Analyse beider Transkriptionsrichtungen des FD Promoters

5 Zur Analyse beider Expressionsrichtungen wurde in zwei Konstrukten die Gene des Selektionsmarkers NptII und des Reporters Glucuronidase unter die Kontrolle des bidirektionalen Promoters gestellt. Dazu wurden die Plasmide pFD+GUS und pFD-GUS mit EcoRI/Sall gespalten und in den Vektor pS5NptIICat (Derivat des pSUN Vektors; WO 02/00900) kloniert. Das resultierende Plasmide UH200 (SEQ ID NO: 3) enthält das GUS Gen unter der Kontrolle der in Richtung des Ferredoxingens wirkenden transkriptionellen Elemente und das NptII Gen unter der Kontrolle des in Richtung OASTL Gen wirkenden transkriptionellen Elemente. Im Plasmid UH201 (SEQ ID NO: 4) befindet sich das GUS Gen unter der Kontrolle der OASTL gerichteten Faktoren und das NptII Gen unter der Kontrolle der das Ferredoxin-Gen steuernden Elemente (siehe Fig.1). Beide Konstrukte wurden in den Agrobakterien-Stamm GV3101[pMP90] transformiert und entsprechend den Protokollen in Tabak und Raps transformiert.

Beispiel: 5 Ergebnisse der Analyse der Kanamycin-Resistenz der transgenen Tabakpflanzen

20 Die selektive Regeneration der Tabakpflänzchen erfolgte auf 100mg/l Kanamycin. 86% der Explantate der mit dem Konstrukt UH200 transformiert waren, entwickelten Sprossknospen. Von den geschnittenen Sprossen bewurzelten sich auf Kanamycin enthaltenden Medium 89%, die nach PCR Analysen alle transgen waren. 70% der Explantate aus dem Transformationsexperiment mit UH201 entwickelten Sprossknospen, von denen 90% sich bewurzelten. Auch hier ergab die PCR Analyse, dass die Pflänzchen das entsprechende Konstrukt enthalten und somit transgen sind. Dieses Beispiel zeigt, dass beide Promotororientierungen in gleicher Weise für die Expression von Selektionsmarkern während selektiver Regeneration von Tabak geeignet sind.

30 **Beispiel 6: Ergebnisse der Analyse der Kanamycin-Resistenz der transgenen Rapspflanzen**

35 Die selektive Regeneration der Rapssprosse erfolgte auf 18 mg/l Kanamycin. Die Transformationseffizienz betrug für das Konstrukt UH200 11% und für UH201 10%. Gleichzeitig wurde die Transformationseffizienz unter der Kontrolle des Promoters der Nopalin Synthase mit 8% ermittelt. Dieses Beispiel zeigte das die selektive Regeneration sowohl unter der Kontrolle des Promoters in der OASTL Richtung (UH200) als auch in der FD Richtung (UH201) mit dem üblicherweise verwendeten nosP vergleichbar ist.

Beispiel 7: GUS-Analyse der Gewebespezifität des bidirektionalen Promoters in den transgenen Tabak und Rapspflanzen.

45 In den transgenen Tabak und Rapspflanzen haben beide Promotororientierungen die gleichen Gewebespezifitäten mit Ausnahme in Pollen gezeigt (Tabelle 1). Während in Raps keine Aktivitäten in den Pollen gefunden wurden, zeigte der Tabakpollen eine deutliche Blaufärbung und damit eine Promoteraktivität. Die GUS Expression reguliert von beider Orientierungen wurde vorwiegend in grünem Gewebe gefunden. In Wurzeln

und Blütenblättern konnte keine Expression nachgewiesen werden. Bereits in sehr jungen Stadien der Samenentwicklung im Raps konnte eine GUS-Aktivität detektiert werden.

Gewebe	A		B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	
	sil	sol												
Tabak	FD	++	++	-	+	+	++	++	+	+	++	-	+	++
	OASTL	+	+	-	+	+	+	+	+	+	++	-	+	++
Raps	FD	++	++	-	++	nd	+	+	+	+	+	-	+	-

5 Tabelle: 1: Übersicht über die Gewebespezifitäten in Tabak und Raps.

++ hohe Aktivität

+ geringere Aktivität

- keine Aktivität; nd: nicht bestimmt

A Blätter (sil: „Sink“ Blätter; sol: „Source“-Blätter)

10 B Wurzeln

C Samen

D Keimling

E Stängel

F Blütenstiele

15 G Nodulen

H Knospe

I Kelchblätter

J Blütenblätter

K Antheren

20 L Pollen.

Zur Verfolgung der Promotoraktivität während der selektiven Regeneration wurden junge Sprosse mit X-Gluc gefärbt. Transgene Sprosse zeigten eine starke Blaufärbung. Dieses Experiment zeigte wieder die gleiche Aktivität des bidirektionalen Promoters in beiden Orientierungen.

Beispiel 8: Quantitative GUS-Analyse des bidirektionalen Promoters in den transgenen Tabakpflanzen

30 Zur quantitativen Analyse der Stärke des FD Promoters wurde parallel von transgenen Pflanzen beider Konstrukte Blatt und Samenmaterial untersucht. Der quantitative GUS Assay wurde entsprechend der Vorschrift von Jefferson mit MUG und 4-Methyl-umbelliferon als Standard durchgeführt. In den Samen der Pflanzen beider Orientierungen wurde eine ähnliche Menge an GUS Aktivität detektiert. Im Blattmaterial war die Expression in beiden Richtungen deutlich messbar, in der Intensität jedoch weniger uniform als im Samenmaterial.

Beispiel 9: Quantitative GUS-Analyse des bidirektionalen Promoters in den transgenen Rapspflanzen

40 Raps wurde - wie oben beschrieben - ebenfalls mit den Konstrukten UH200 und UH201 transformiert. Eine quantitative GUS Analyse von Blattmaterial transgener Rapspflanzen zeigte, dass beide Promotorrichtungen eine gleiche Aktivität zeigten. In Fig. 2 sind die Werte der einzelnen Linien dargestellt. Die Höhe der Expression entspricht den anderen polarer pflanzlicher Promotoren.

Patentansprüche

1. Transgene Expressionskassetten zur Expression von zwei Nukleinsäuresequenzen in einer pflanzlichen Zelle umfassend mindestens eine regulatorische Sequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

5 a) dem Promotor gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2,

10 b) funktionellen Äquivalenten des Promotor gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2, die eine Identität von mindestens 80% zu der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2 aufweisen und die im wesentlichen die gleiche Promotoraktivität wie der Promotor gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2 besitzen,

15 c) funktionellen Äquivalenten des Promotor gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2, welche mindestens 25 aufeinanderfolgende Nukleotide der Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2 umfassen und die im wesentlichen die gleiche Promotoraktivität wie der Promotor gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2 besitzen, und

20 d) funktionell äquivalente Fragmente der Sequenzen a) oder b) oder c), die mindestens 25 aufeinanderfolgende Nukleotide besagter Sequenzen a) oder b) oder c) aufweisen und im wesentlichen die gleiche Promotoraktivität wie der Promotor gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2 besitzen,

25 wobei besagtes regulatorisches Element zwischen zwei Nukleinsäuresequenzen angeordnet ist und in Bezug auf besagte Nukleinsäuresequenzen heterogen ist und mit besagten Nukleinsäuresequenzen funktionell so verknüpft ist, dass in mindestens einer pflanzlichen Zelle die Expression von zwei unterschiedlichen Ribonukleinsäuresequenzen bewirkt wird, wobei besagte Ribonukleinsäuresequenzen ausgewählt sind aus Ribonukleinsäuresequenzen kodierend für

30 i) Aminosäuresequenzen oder
ii) Ribonukleinsäuresequenzen, die eine Verminderung der Expression mindestens eines endogenen Gens besagter pflanzlichen Zelle bewirken.

35 2. Expressionskassette nach Anspruch 1, wobei die beiden transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen unterschiedlich sind und für eine der folgenden Kombinationen kodieren

40 i) Selektionsmarker und Reporterprotein
ii) Zielprotein und Selektionsmarker oder Reporterprotein
ii) Zwei Zielproteine aus dem gleichen Stoffwechselweg
iii) Sense und antisense RNA
iv) Verschiedene Proteine zur Pathogenabwehr

45

2

3. Expressionskassette nach Anspruch 1 oder 2, wobei mindestens eine der transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen ausgewählt ist aus Nukleinsäuren kodierend für Selektionsmarker, Reportergene, Cellulasen, Chitinases, Glucanases, Ribosom-Inaktivierende Proteine, Lysozyme, *Bacillus thuringiensis* Endotoxinen, α -Amylaseinhibitoren, Proteaseinhibitoren, Lektinen, RNAasen, Ribozymen, Acetyl-CoA-Carboxylasen, Phytasen, 2S Albumin aus *Bertholletia excelsa*, "antifreeze"-Proteinen, Trehalosephosphatphosphatasen, Trehalosephosphatphosphatasen, Trehalasen, DREB1A-Faktor, Farnesytransferasen, Ferritin, Oxalatoxidasen, Calcium-abhängigen Proteinkinasen, Calcineurinen, Glutamatdehydrogenasen, N-hydroxylierende, multifunktionelle Cytochrom P-450, transkriptioneller Aktivator CBF1, Phytoendesaturasen, Polygalakturonasen, Flavonoid-3'-hydroxylasen, Dihydroflavanol-4-reduktasen, Chalconisomerasen, Chalconsynthasen, Flavanone-3-beta-hydroxylasen, Flavonsynthase II, Verzweigungsenzyme Q, "Starch Branching" Enzyme.

15 4. Transgene Expressionskassette nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei mindestens eine der transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus positiven Selektionsmarkern, negativen Selektionsmarkern und Faktoren die einen Wachstumsvorteil gewähren.

20 5. Transgene Expressionskassette nach Anspruch 2 oder 4, wobei der Selektionsmarker ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Proteinen, die eine Resistenz gegen Antibiotika, Metabolismus-Inhibitoren, Herbicide oder Biozide verleihen.

25 6. Transgene Expressionskassette nach einem der Ansprüche 2, 4 oder 5, wobei der Selektionsmarker ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Proteinen, die eine Resistenz verleihen gegen Phosphinothricin, Glyphosat, Bromoxynil, Dalapon, 2-Desoxyglucose-6-phosphat, Tetracyclin, Ampicillin, Kanamycin, G 418, Neomycin, Paromomycin, Bleomycin, Zeocin, Hygromycin, Chloramphenicol, Sulfonylharnstoff-Herbicide, Imidazolinon-Herbicide.

30 7. Transgene Expressionskassette nach einem der Ansprüche 2 oder 4 bis 6, wobei der Selektionsmarker ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Phosphinothricinacetyltransferasen, 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat synthetasen, Glyphosat-oxidoreduktasen, Dehalogenase, Nitrilasen, Neomycinphosphotransferasen, DOG^R1-Genen, Acetolactatsynthetasen, Hygromycinphosphotransferasen, Chloramphenicolacetyltransferasen, Streptomycinadenylyltransferasen, β -Lactamasen, tetA Genen, tetR Genen, Isopentenyltransferasen, Thymidinkinasen, Diphtheria-toxin A, Cytosindeaminase (codA), Cytochrom P450, Haloalkandehalogenasen, iaaH Gene, tms2 Gene, β -Glucuronidasen, Mannose-6-phosphat-Isomerasen, UDP-Galaktose-4-Epimerasen.

35 8. Transgener Expressionsvektor enthaltend eine Expressionskassette gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7.

40

45

9. Transgener nicht-menschlicher Organismus transformiert mit einer transgenen Expressionskassette gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7 oder einem transgenen Expressionsvektor gemäß Anspruch 8.

5 10. Transgener nicht-menschlicher Organismus nach Anspruch 9 ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Bakterien, Hefen, Pilzen, tierischen und pflanzlichen Organismen.

10 11. Transgener nicht-menschlicher Organismus nach einem der Ansprüche 9 oder 10, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Arabidopsis, Tomate, Tabak, Kartoffeln, Mais, Raps, Weizen, Gerste, Sonnenblumen, Hirse, Rübe, Roggen, Hafer, Zuckerrübe, Bohnengewächse und Soja.

15 12. Zelle, Zellkulturen, Teile oder transgenes Vermehrungsgut abgeleitet von einem transgenen nicht-menschlichen Organismus nach einem der Ansprüche 9 bis 11.

13. Verfahren zur transgenen Expression von zwei Ribonukleinsäuresequenzen in pflanzlichen Zellen, wobei eine Expressionskassetten umfassend mindestens eine regulatorische Sequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

20 a) dem Promotor gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2,

b) funktionellen Äquivalenten des Promotor gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2, die eine Identität von mindestens 80% zu der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2 aufweisen und die im wesentlichen die gleiche Promotoraktivität wie der Promotor gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2 besitzen,

25 c) funktionellen Äquivalenten des Promotor gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2, welche mindestens 25 aufeinanderfolgende Nukleotide der Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2 umfassen und die im wesentlichen die gleiche Promotoraktivität wie der Promotor gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2 besitzen, und

30 d) funktionell äquivalente Fragmente der Sequenzen a) oder b) oder c), die mindestens 25 aufeinanderfolgende Nukleotide besagter Sequenzen a) oder b) oder c) aufweisen und im wesentlichen die gleiche Promotoraktivität wie der Promotor gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2 besitzen,

35 in mindestens eine pflanzliche Zelle eingebracht wird,

40 wobei besagtes regulatorisches Element zwischen zwei Nukleinsäuresequenzen angeordnet ist und in Bezug auf besagte Nukleinsäuresequenz heterogen ist und mit besagten Nukleinsäuresequenzen funktionell so verknüpft ist, dass in mindestens besagter pflanzlichen Zelle die Expression besagter zwei unterschiedlichen Ribonukleinsäuresequenzen bewirkt wird, wobei besagte Ribonukleinsäuresequenzen ausgewählt sind aus Ribonukleinsäuresequenzen kodierend für

45

- i) Aminosäuresequenzen oder
- ii) Ribonukleinsäuresequenzen, die eine Verminderung der Expression mindestens eines endogenen Gens besagter pflanzlichen Zelle bewirken.

5 14. Verfahren nach Anspruch 13, wobei die beiden transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen unterschiedlich sind und für eine der folgenden Kombinationen kodieren

- i) Selektionsmarker und Reporterprotein
- ii) Zielprotein und Selektionsmarker oder Reporterprotein
- ii) Zwei Zielproteine aus dem gleichen Stoffwechselweg
- iii) Sense und antisense RNA
- iv) Verschiedene Proteine zur Pathogenabwehr

15 15. Verfahren nach Anspruch 13 oder 14, wobei mindestens eine der transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz ausgewählt ist aus Nukleinsäuren wie definiert in einem der Ansprüche 3 bis 7.

20 16. Verwendung eines transgenen nicht-menschlichen Organismus nach einem der Ansprüche 9 bis 11 oder von diesem abgeleitete Zellkulturen, Teile oder transgenes Vermehrungsgut nach Anspruch 12 zur Herstellung von Nahrungs-, Futtermitteln, Saatgut, Pharmazeutika oder Feinchemikalien.

25 17. Verwendung nach Anspruch 16, wobei die Feinchemikalien Antikörper, Enzyme, pharmazeutisch aktive Proteine, Vitamine, Aminosäuren, Zucker, gesättigte oder ungesättigte Fettsäuren, natürliche oder synthetische Geschmacks-, Aroma- oder Farbstoffe sind.

30 18. Verfahren zur Herstellung von Pharmazeutika oder Feinchemikalien in transgenen Organismen nach einem der Ansprüche 9 bis 11 oder von diesen abgeleiteten Zellkulturen, Teilen oder transgenes Vermehrungsgut nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass der transgene Organismus gezüchtet und das gewünschte Pharmazeutikum oder die gewünschte Feinchemikalie isoliert wird.

Expressionskassetten zur bidirektionalen transgenen Expression von Nukleinsäuren in Pflanzen

Zusammenfassung

5 Die Erfindung betrifft transgene Expressionskassetten zur Expression von zwei Nukleinsäuresequenzen in einer pflanzlichen Zelle umfassend mindestens eine regulatorische Sequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

10 a) dem Promotor gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2,

b) funktionellen Äquivalenten des Promotor gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2, die eine Identität von mindestens 80% zu der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2 aufweisen und die im wesentlichen die gleiche Promotoraktivität wie der Promotor gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2 besitzen,

15 c) funktionellen Äquivalenten des Promotor gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2, welche mindestens 25 aufeinanderfolgende Nukleotide der Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2 umfassen und die im wesentlichen die gleiche Promotoraktivität wie der Promotor gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2 besitzen, und

20 d) funktionell äquivalente Fragmente der Sequenzen a) oder b) oder c), die mindestens 25 aufeinanderfolgende Nukleotide besagter Sequenzen a) oder b) oder c) aufweisen und im wesentlichen die gleiche Promotoraktivität wie der Promotor gemäß SEQ ID NO: 1 oder 2 besitzen,

25 wobei besagtes regulatorisches Element zwischen zwei Nukleinsäuresequenzen angeordnet ist und in Bezug auf besagte Nukleinsäuresequenzen heterogen ist und mit besagten Nukleinsäuresequenzen funktionell so verknüpft ist, dass in mindestens einer pflanzlichen Zelle die Expression von zwei unterschiedlichen Ribonukleinsäuresequenzen bewirkt wird, wobei besagte Ribonukleinsäuresequenzen ausgewählt sind aus Ribonukleinsäuresequenzen kodierend für

30 i) Aminosäuresequenzen oder

ii) Ribonukleinsäuresequenzen, die eine Verminderung der Expression mindestens eines endogenen Gens besagter pflanzlichen Zelle bewirken.

35

SEQUENCE LISTING

<110> SunGene GmbH&Co.KGaA
<120> Expressionskassetten zur bidirektionale transgenen Expression von
5 Nukleinsäuren in Pflanzen
<130> AE 20030535
<160> 6
<170> PatentIn version 3.1

10 <210> 1
<211> 429
<212> DNA
<213> Arabidopsis thaliana

15 <220>
<221> promoter
<222> (1)..(429)
<223>

20 <400> 1
gtatggaaaatcatttcga atgatgagat atatgatctc tttgggtgtca gtcacatggc 60
acacgcgtatc aatttagaaa aacgcgggtgg ttggtcacca gaattactac ttctcggtct 120
gatttggtca tatccgtatt aagtccgtt aatattttcc ataaactgggg tttgaacatt 180
cggtttcttt ttttcagttt gtccgatttgg gagtttttag tatggaaaaaa taataactgaa 240
25 tttatattgtt caaaactgttt tggaaaaaaat attccctta attacgaata taattaaaat 300
tttaaaatttc attttatttag atcttggtta attcggttta atgcatttaat gaatttcgg 360
ttaagtcgg tttcggttt tatgtcccac cactatctac aaccgatgat caaccttatac 420
tccgtatttc 429

30 <210> 2
<211> 836
<212> DNA
<213> Arabidopsis thaliana

35 <220>
<221> promoter
<222> (344)..(772)
<223>

40 <220>
<221> Intron
<222> (14)..(281)
<223> 1st intron of OASTL gene

45 <220>

<221> 5'UTR
<222> (773)..(836)
<223> 5'UTR of FD gene

5 <220>
<221> 5'UTR
<222> (1)..(343)
<223> 5'-UTR of OASTL gene comprising intron

10 <400> 2
gatccaaagct tcactgctta aattcacaaa aagagaaaaag taagacccaa ggaataaaatc 60
atcctcaaac caaaaacaca tcatacaaaa tcatcaaaca taaatctcca gatgtatgag 120
caccatcca gtatacaca actcttaaca ccaaatac ac agatttaaca gcgaaataag 180
cttaagccca tacaattatc cgatccaaac aaataataatc gaaaccggca gaggaataag 240
15 caagtgaatc aaaaagtatg ggacgaggaa gaqatgata cctgaatgag aaagtcaata 300
accttgaccc gaatcgttt gaagaaaatg gagaaaatcg gttgtatgga ataaaatctt 360
cgaatgatga gatatatgat ctcttggtg tcagtcacat ggcacacgct atcaatttag 420
aaaaacgcgg tgggtggca ccagaattac tacttctcg tctgatttgg tcatatccgt 480
attaagtccg gtaatattt tccataactg gggtttgaac attcggttcc ttttttcag 540
20 ttagtccgat ttggagttt gagtatggaa aaataataact gaatttattt gttcaaactg 600
ttttggaaaa aatatttccc ttaattacga atataatcaa aattttaaaa ttcattttat 660
tagatcttgg ttaattcggt ttaatgcatt aatgaatttc ggttaagtgc ggttttccgt 720
tttatgtcc caccactatc tacaaccgat gatcaaccctt atctccgtat tcaccacaaa 780
cagtcatcac tctcacttga cacaactt ctttgcgtc cgtctctctg tctctc 836

25 <210> 3
<211> 11533
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

30 <220>
<223> Expression vector UH200

35 <400> 3
ttccatggac atacaaatgg acgaacggat aaacctttc acgccctttt aaatatccga 60
ttattctaat aaacgctctt ttctcttagg tttacccgcc aatataatcct gtc当地acact 120
gatagttaa actgaaggcg ggaaacgaca atcagatcta gtaggaaaca gctatgacca 180
tgattacgcc aagcttgcattt gccgatcccc cccactccgc cctacactcg tatataatg 240
cctaaacctg ccccggttccatatgtat attattattt cattattagg tataagatag 300
40 taaacgataa ggaaagacaa ttatgttggaa aagccatgct aaaatataga tagatatacc 360
tttagcagggtt tttatgttac aacataacat aacatagtag ctatccagca ggcaggctaa 420
aacatagtagt agtctatctg caggggtac ggtcgactct agacttagtgg atccgtcga 480
gctagcttgg gtcccgctca gaagaactcg tcaagaaggc gatagaaggc gatgcgtc 540
gaatcgggag cggcgataac gtaaagcactg aggaagccgt cagcccatcc gcccgaac 600
45 tcttcagcaa tatcacgggt agccaaacgct atgtcctgtat agcggtccgc cacacccagc 660

	cggccacagt ccatgaaatcc agaaaagcg ggatccat ccatgatatt cggcaagcag	720
	gcatcggcat ggtcacgac gagatcctcg ccgtcgggca tgcgcgcctt gagcctggcg	780
	aacagttcgg ctggcgcgag cccctgatgc tcttcgtcca gatcatcctg atcgacaaga	840
	ccggcttcca tccgagtagc tgctcgctcg atgcgatgtt tcgcttggcg gtcgaatggg	900
5	caggtagccg gatcaagcgt atgcagccgc cgcattgcat cagccatgat ggatacttgc	960
	tcggcaggag caaggtgaga tgacaggaga tcctgccccg gcaacttcgccc caatagcagc	1020
	cagtccttc ccgcttcagt gacaacgtcg agcacagctg cgcaagggAAC gcccgtcgtg	1080
	gccagccacg atagccgcgc tgcctcgcc tgcagttcat tcagggcacc ggacaggtcg	1140
	gtcttgacaa aaagaaccgg gcccctgc gctgacagcc ggaacacacggc ggcacatcagag	1200
10	cagccgatttgc tctgttgc ccagtcatacg ccgaatagcc tctccaccca agcggccgga	1260
	gaacctcggt gcaatccatc ttgttcaatc caagctccca tggccctcg actagagtcg	1320
	agatccgata tcgccccggc tgcactctcg aggatccaag cttcaactgtt taaattcaca	1380
	aaaagagaaa agtaagacca aaggaataaaa tcatcctcaa accaaaaaca catcatacaa	1440
	aatcatcaaa cataaaatctc cagatgtatg agcaccaatc cagttataca acactctaa	1500
15	caccaaatca acagatttaa cagcggaaata agcttaagcc catacaatta tccgatccaa	1560
	acaaaatataa tcgaaaaccgg cagaggaata agcggatgttcaaaaagta tgggacgagg	1620
	aagaagatga tacctgaatg agaaaagtcaa taaccttgcg ccgaatcggtt ttgaagaaaa	1680
	tggagaaaaat cggttgcgtatg gaataaaaatc ttcgaatgtatg gagatataatg atctcttgg	1740
	tgtcagtcac atggcacacacg ctatcaattt agaaaaacgc ggtgggttgc caccagaatt	1800
20	actacttctc ggtctgattt ggtcatatcc gtattaagtc cggttaatattttccataac	1860
	tggggtttga acattcggtt tcttttttc agttgtccg atttggagtt ttgagtatgg	1920
	aaaaataataa ctgaattttat ttgttcaaac tggggggaa aaaatatttc ccttaattac	1980
	gaatataattt aaaaattttaa aattcattttt attagatctt ggttaattcg gtttaatgca	2040
	ttaatgaatt tcgggtttaag tcgggtttcg gttttatgt cccaccacta tctacaacccg	2100
25	atgatcaacc ttatctccgt attcaccacaa aacagtcatc actctcactt gacacaaaaaa	2160
	ctctttgtc tcgtctctc tgtctctcg atccccgggt aggtcagtcc cttatgttac	2220
	gtcctgtaga aaccccaacc cgtgaaatca aaaaactcga cggcctgtgg gcattcagtc	2280
	tggatcgcga aaactgtggaa attggtcagc gttgggtggaa aagcgcgtta caagaaagcc	2340
	gggcaattgc tggccaggaa gtttttaacg atcaagttcg ccgtatgccag atattcgtaa	2400
30	ttatgcggc aacgtcttgg tatcagcgcc gaagtcttta ttccgaaagg ttgggcaggc	2460
	cagcgtatcg tgcgtcggtt cgtatcgcc actcattacg gcaaaagtgtg ggtcaataat	2520
	caggaagtga tggagcatca gggcggtat acgcatttg aagccgtgt cacggctat	2580
	gttattgccc gggaaaagtgt acgtaagttt ctgcttctac ctttgcataataataataa	2640
	ttatcattaa ttatcgatcaataataatattt caaatatattt ttccaaaata aaagaatgtat	2700
35	gtatatacgatca attgcttttc tggatgttat aagtgtgtat attttatattt ataaactttc	2760
	taatataatgc cccaaaatttg ttgatgtgcg ggtatcaccg tttgtgtgaa caacgaactg	2820
	aactggcaga ctatcccgcc gggaaatgggtt attaccgacg aaaacggcaa gaaaaacgcag	2880
	tcttacttcc atgatttctt taactatgcc gggaaatccatc gcagcgtaat gctctacacc	2940
	acgcccacca cctgggtggaa cgatatcacc gttgggtacgc atgtcgcgcgca agactgtac	3000
40	cacgcgtctg ttgactggca ggtgggtggcc aatgggtatg tcagcgatgc actgcgtat	3060
	gcggatcaac aggtgggttgc aactggacaa ggcactagcg ggactttgca agtgggtgaa	3120
	ccgcacatctt ggcacccggg tggatgttat ctctatgcac tggcgtcactt agccaaaagc	3180
	cagacagagt gtgatgtatcta cccggttcgc gtcggcatcc ggtcagtgcc agtgaaggc	3240
	gaacagttcc tggatgtatcta caaaccgttc tactttactg gctttggcg tcatgtatgtat	3300
45	gcggacttac gttggcaaaagg attcgataac gttgtatgg tgcacgcacca cgcattaaatg	3360

5	gactggattg gggccaactc ctaccgtacc tcgcattacc cttacgctga agagatgctc gactggcag atgaacatgg catcggttg attgatgaaa ctgctgctgt cggtttaac ctctcttag gcattggttt cgaagcgggc aacaagccga aagaactgta cagcgaagag gcagtcaacg gggaaactca gcaagcgcac ttacaggcga taaaagagct gatagcgcgt gacaaaaacc acccaagcgt ggtgatgtgg agtattgcca acgaaccgga taccggccg caagtgcacg ggaatatttc gccactggcg gaagcaacgc gtaaaactcga cccgacgcgt ccgatcacct gcgtcaatgt aatgttctgc gacgctcaca ccgataccat cagcgtatc tttgatgtgc tgcgtcgaa ccgttattac ggatggatg tccaaagcgg cgatttgaa acggcagaga aggtactgga aaaagaactt ctggcctggc aggagaaaact gcatcagcgg attatcatca ccgaatacgg cgtggatacg ttagccggc tgcactcaat gtacaccgac atgtggatg aagagtatca gtgtgcattgg ctggatatgt atcaccgcgt ctttgatcgc gtcagcgcg tcgtcggtga acaggtatgg aatttcgcgg attttgcac ctcgcaggc atattgcgcg ttggcggtaa caagaaaggg atcttcaactc ggcgaccgcaa accgaagtcg gcggctttc tgctgcaaaa acgctggact ggcataact tcggtaaaaa accgcagcag ggaggcaaac aatgaatcaa caactctcct ggcgcaccat cgtcgctac agcctcgaaa attgctaccg agctcggtac cggcgcaaa aatcaccagt ctctctctac aatctatct ctctctattt ttctccagaa taatgtgtga gtatgtccca gataagggaa ttagggttct tatagggttt cgctcatgtg ttgagcatat aagaaaccct tagtatgtat ttgtatttgt aaaatacttc tatcaataaa atttctaatt cctaaaacca aatccagtg accgggttacc gagctcgaat tcactggccg tcgttttaca acgactcagc agcttgcacag gaggcccgat ctagtaacat agatgacacc ggcgcgcata atttaccta gtttgcgcgc tatattttgt tttctatcgc gtattaaatg tataattgcg ggactctaata cataaaaacc catctcataa ataacgtcat gcattacatg ttaattatta catgcttaac gtaattcaac agaaattata tgataatcat cgcaagaccg gcaacaggat tcaatcttaa gaaactttat tgccaaatgt ttgaacgatc ggggatcatc cgggtctgtg gcgggaactc cacaaaaata tccgaacgca gcaagatcg tcgatcgact cagatctggg taactggcct aactggcctt ggaggagctg gcaactcaaa atcccttgc caaaaacca catcatgcac tccaccatgc ttgtatccag ccgcgcgcaaa tgtacccgc gctgtgtatc ccaaagcctc atgcaaccta acagatggat cgtttggaaag gcctataaca gcaaccacag actaaaaacc ttgcgcctcc atagacttaa gcaaatgtgt gtacaatgtt gatccttaggc ccaaccttg atgcctatgt gacacgtaaa cagtaacttc aactgtccaa tcgtaaagcgt tcctagcctt ccagggccca gctgtacca taccagccac aacaccctca acctcagcaa ccaaccaagg gtatctatct tgcaacctct ctaggtcatc aatccactct tttttttttt gtggctctgt cctaaagttc actgttagacg tctcaatgtt atggtaacg atgtcacaaa ccgcggccat atcggctgct gtagctggcc taatctcaac tggctccctc tccggagaca tggcgagatt atttggattt agagtgtaaa tgagactcta attggataacc gagggaaatt tatggacatc cagtgagca tttttgacaa gaaatatttgc ttagctgata gtgaccccttgc gctgtgtatc aacgcgcata aatggtttct gacgtatgtg ctttagctcat taaactccag aaacccgcgg ctgagttgc cttcaacgt tgcgggtctg ttagttccaa acgtaaaaacg gcttgcctcc cgtcatcgcc gggggtcata acgtgactcc cttaaattctc cgctcatgtatc cagattgtcg tttccgcct tcagttaaa ctatcgtgt ttgacaggat cctgcttggt aataattgtc attagattgt ttttatgcac agatgcactc gaaatcagcc aatttttagac aagtatcaaa cggatgttac ttcaactac taaagacgtc cgcaatgtgt tattaaatgttgc tctaaagcgtc aatttggtttca caccacaata tacccctgcca ccagccagcc aacagctccc cgaccggcag ctcggcaca aatcaccacg cgttaccacc accgcggccg gccgcattgtt gttgaccgtt ttcggccggca ttgcccggatt	3420 3480 3540 3600 3660 3720 3780 3840 3900 3960 4020 4080 4140 4200 4260 4320 4380 4440 4500 4560 4620 4680 4740 4800 4860 4920 4980 5040 5100 5160 5220 5280 5340 5400 5460 5520 5580 5640 5700 5760 5820 5880 5940 6000 6060
10		
15		
20		
25		
30		
35		
40		
45		

	cgagcgttcc ctaatcatcg accgcacccg gagcgggcgc gaggccgcca aggcccggagg	6120
	cgtgaagttt ggccccggcc ctaccctcac cccggcacag atcgcgcacg cccgcgagct	6180
	gatcgaccag gaaggccgca cctgtaaaaga ggcggctgca ctgttggcg tgcacatcgctc	6240
5	gaccctgtac cgcgacttg agcgcacgca ggaagtgcacg cccaccgagg ccaggccggcg	6300
	cgggccttc cgtgaggacg cattgaccga ggccgacgccc ctggccggcc cgagaatgaa	6360
	acgccaagag gaacaagcat gaaaccgcac caggacggcc aggacgaaacc gtttttcatt	6420
	accgaagaga tcgaggccga gatgatcgcc gcccggta cg tttcgagcc gcccgcac	6480
	gtctcaaccg tgccgctgca taaaatcctg gcccggttgt ctgatgccaa gctggccggcc	6540
	tggccggcca gcttggccgc tgaagaaaacc gagcgcgcgc gtctaaaaag gtatgtgt	6600
10	ttttagtaaa acagcttgcg tcatgcggtc gctgcgtata tgatgcgtat agtaaaataaa	6660
	caaatacgca aggggaacgc atgaaggta tcgctgtact taaccagaaa ggcgggtcag	6720
	gcaagacgac catcgcaacc catctagccc gcgcctgca actcgccggg gccgatgttc	6780
	tgtagtgcg ttccgatccc cagggcagtg cccgcattg ggcggccgtg cggaaagatc	6840
	aaccgcta ac cttgtcgcc atcgaccgc cgcgcattga cgcgcacgtg aaggccatcg	6900
15	gcccgcgca cttctgtatg atcgacggag cgcggcaggc ggcggacttg gctgtgtccg	6960
	cgatcaaggc agccgacttc gtgcgtattc cggcgcagcc aagcccttac gacatatggg	7020
	ccaccgcgcg cctgggtggag ctggtaagc agcgcattga ggtcacggat ggaaggctac	7080
	aagcggcctt tgcgtgtcg cggcgcgtca aggcgcgcg catcgccgt gagggtgccc	7140
	aggcgcgtggc cgggtacgag ctgcatttgc ttgagttcccg tattcaccgc cgcgtgagct	7200
20	accaggcac tgccgcgcg ggcacaaccc ttcttgcattc agaaccgc ggcgcacgcgt	7260
	cccgcgaggc ccaggcgctg gccgctgaaa ttaaatcaaa actcatttgc gttatgagg	7320
	taaagagaaa atgagcaaaa gcacaaacac gctaagtgcg ggcgcgtccga ggcgcacgc	7380
	cagcaaggct gcaacgttgg ccagcctggc agacacgcgc gccatgaaagc gggtaactt	7440
	tcaaggccgcg cgggaggatc acaccaagct gaagatgtac gcggtacgc aaggcaagac	7500
25	cattaccgag ctgctatctg aatacatcgcc gcagctacca gagtaatgaa gcaatgaat	7560
	aaatgagtag atgaattttt gcccgtaaag gaggccgc gggaaatcaa gaacaaccag	7620
	gcaccgcacgc cgtggatgc cccatgtgtg gaggaacggg cgggtggccca ggcgttaagcg	7680
	gctgggttgcg ctggccggccc tgcaatggca ctggaaacccc caagcccgag gaatcgccgt	7740
	gagcggtcgc aaaccatccg gcccggtaca aatcgccgcgc ggcgtgggtg atgaccttgt	7800
30	ggagaagttt aaggccgcgc aggccgcgc gccgcacgc atcgaggcag aagcacgc	7860
	cggtgaatcg tggcaagccg cgcgtatcg aatccgcataa gaatccggc aaccgcggc	7920
	agccggcgcg cgcgtgatcg ggaagccgc caagggcgc ggcgcacgc attttttgt	7980
	tccgatgttc tatgacgtgg gcacccgcga tagtcgcagc atcatggacg tggccgttt	8040
	ccgtctgtcg aagcgtgacc gacgagctgg cgaggtgatc cgctacgc tccagacgg	8100
35	gcacgttagag gttccgcag gcccggccgg catggccagt gtgtgggatt acgaccttgt	8160
	actgatggcg gttcccatc taaccgaatc catgaacccg taccggaaag ggaaggaga	8220
	caagccggc cgcgtgttcc gtccacacgt tgcggacgta ctcaagtttgc gcccgcgc	8280
	cgatggccgaa aagcagaaag acgaccttgtt agaaacctgc attcggttac acaccacgc	8340
	cggtgcattc cagcgtacga agaaggccaa gacggccgc ctgggtacgg tatccgaggg	8400
40	tgaaggctt attagccgt acaagatcg aaagagcga accggccggc cggagatcat	8460
	cgagatcgag ctatgttgcatt ggtatgtaccg cgagatcaca gaaggcaaga acccgacgt	8520
	gctgcacgtt caccggatt actttttgtat cgatccggc atcgccgtt ttctctaccg	8580
	cctggcacgc cgcgcgcgc gcaaggcaga agccagatgg ttgttcaaga cgatctacga	8640
	acgcagtgcc acgcgcggag agttcaagaa gttctgtttc accgtgcgcg agctgatcg	8700
45	gtcaaatgac ctgcggagc acgattgaa ggaggaggcg ggcgcaggctg gcccgtatct	8760

	agtcatgcgc taccgcaacc tgatcgaggg cgaagcatcc gccggttcct aatgtacgga	8820
	gcagatgcta gggcaaattg ccctagcagg ggaaaaaagggt cgaaaaaggtc tctttcctgt	8880
	ggatagcacg tacattggga acccaaagcc gtacattggg aaccggaacc cgtacattgg	8940
	gaacccaaag ccgtacattg ggaaccggtc acacatgtaa gtgactgata taaaagagaa	9000
5	aaaaggcgat tttccgcct aaaactcttt aaaacttatt aaaactctta aaacccgcct	9060
	ggcctgtgca taactgtctg gccagcgcac agccgaagag ctgcaaaaag cgcctaccct	9120
	tcggtcgtg cgctccctac gccccggcgc ttgcgtcgg cctatgcgg cgcgtggccg	9180
	ctcaaaaatg gctggcctac ggccaggcaa tctaccaggg cgccgacaag ccgcggcgtc	9240
10	gccactcgac cgccggcgcc cacatcaagg caccctgcct cgccgttgc ggtgatgacg	9300
	gtgaaaacct ctgacacatg cagctccgg agacggtcac agctgtctg taagcggatg	9360
	ccgggagcag acaagccgt cagggcgcgt cagcgggtgt tggcgggtgt cggggcgcag	9420
	ccatgaccca gtcacgttagc gatagcggag tgtatactgg cttaactatg cggcatcaga	9480
	gcagattgtt ctgagagtgc accatatgcg gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaaggag	9540
15	aaaataccgc atcaggcgct cttccgcctc ctcgctcaact gactcgctgc gctcggtcgt	9600
	tcggctgcgg cgagcggtat cagctcaactc aaaggcggtt atacggttat ccacagaatc	9660
	aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa	9720
	aaaggcccg ttcgtggcgt tttccatag gctccgcctt cctgacgagc atcacaaaaa	9780
	tcgacgctca agtcagaggt ggcgaaaccc gacaggacta taaagatacc aggcgttcc	9840
20	cccttggaa tccctcggtc gctctcctgt tccgaccctg ccgcattaccg gatacctgtc	9900
	cgcccttctc cttccggaa gcgtggcgt ttctcatagc tcacgctgtt ggtatctcag	9960
	ttcgggtgtt gtcgttcgtt ccaagctggg ctgtgtgcac gaacccccc ttcagccga	10020
	ccgctgcgtcc ttatccggta actatcgct ttagtccaaac ccggtaagac acgacttac	10080
	gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag gcgggtgtac	10140
	agagttctt aagtggtggc ctaactacgg ctacactaga aggacagttt ttggtatctg	10200
25	cgctctgctg aagccagttt cttccggaaa aagagtttgtt agctttgtat ccggcaaaaca	10260
	aaccaccgct ggtagcgggtt gttttttgtt ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa	10320
	aggatctcaa gaagatcctt tgatctttt tacgggtctt gacgctcagt ggaacgaaaa	10380
	ctcacgtttaa gggatttgg tcatgcatga tatatctccc aattttgtttaa gggcttattta	10440
	tgcacgctta aaaataataa aagcagactt gacctgatag tttggctgtt agcaattatg	10500
30	tgcttagtgc atctaacgct tgatgtttaa cgcgcgcga agcggcgtcg gcttgaacga	10560
	atttcttagt agacattatt tgccgactac cttgggtgtatc tcgccttca cgtatggac	10620
	aaattcttcc aactgatctg cgcgcgaggc caagcgatct tcttctgtc caagataagc	10680
	ctgtctagct tcaagtatga cgggctgata ctggggccggc aggcgctcca ttgcccagtc	10740
	ggcagcgcaca tccttcggcg cgattttgcc ggttactgcg ctgttacaaa tgccggacaa	10800
35	cgtaagcact acatttcgtt catcgccagc ccagtcgggc ggcgagttcc atagcgtaa	10860
	ggtttcattt agcgctcaa atagatctgtt ttcaggaacc ggatcaaaga gttcctccgc	10920
	cgctggaccc accaaggcaa cgctatgttc tcttgcctt gtcagcaaga tagccagatc	10980
	aatgtcgatc gtggctggct cgaagatacc tgcaagaatg tcattgcgtc gccattctcc	11040
	aaatttgcagt tcgcgtttag ctggataacg ccacggaaatg atgtcgatcgt gcacaacaat	11100
40	ggtgacttct acagcgcggaa gaatctcgct ctctccaggaa gaaaggccaaatg tttccaaaag	11160
	gtcggtgtatc aaagctcgcc gcgttgcgtt atcaagccctt acgggtcaccg taaccagcaa	11220
	atcaaatatca ctgtgtggct tcaggccgccc atccactgcg gagccgtaca aatgtacggc	11280
	cagcaacgtc ggttgcgat ggcgcgtat gacgccaact acctctgata gttgagtcga	11340
	tacttcggcg atcaccgcctt ccccatgtat gtttaacttt gtttttagggc gactgccttg	11400
45	ctgcgttaaca tcgttgctgc tccataacat caaacatcga cccacggcgt aacgcgttgc	11460

ctgcttggat gcccgaggca tagactgtac cccaaaaaaaaa cagtcataaac aagccatgaa 11520
aaccgcact gcg 11533

<210> 4

5 <211> 11533

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10 <223> Expression vector UH201

<400> 4

15	ttccatggac atacaaaatgg acgaacggat aaacctttc acgccccttt aatatatccga ttattcta ataacgcttt ttctctttagg tttacccgccc aatataatcct gtc当地 gatagttaa actgaaggcg ggaaacgaca atcagatcta gtaggaaaca gctatgacca tgattacgcc aagcttgc ggcgatcccc cccactccgc cctacactcg tatataatcg cctaaacctg ccccttcct catatgtat attattattt cattattagg tataagatag taaaccgataa ggaaagacaa tttattgaga aagccatgct aaaatataga tagatatacc ttagcaggtg tttatattac aacataacat aacatagtag ctagccagca ggcaggctaa aacatagtagt atgttatctg cagggggta cgtcgactt agactagtgg atccgtcgaa gctagcttgg gtcccgctca gaagaactcg tcaagaaggc gatagaaggc gatgcgctgc gaatcgggag cggcgatacc gtaaaagcacg aggaagcggg cagcccatcc gccgccaagg tcttcagcaa tattcacgggt agccaaacgct atgtcctgtat agcggtccgc cacacccagc cgccacagt cgatgaatcc agaaaagcgg ccattttcca ccatgatatt cggcaaggcag 25	720
20	gcatgccc at gggcacgac gagatcctcg ccgtcgggca tgcgcgcctt gagcctggcg aacagttcg ctggcgcgag cccctgtatgc tcttcgttca gatcatctg atcgacaaga ccggcttcca tccgagtacg tgctcgctcg atgcgtatgtt tgcgttggg gtcgaatggg caggtagccg gatcaaggct atgcagccgc cgcattgtat cagccatgtat ggataactttc tcggcaggag caaggtgaga tgacaggaga tcctgccccg gcacttcgccc caatagcagc 30	1020
30	cagtcccttc ccgcttcagt gacaacgtcg agcacagctg cgcaaggaac gcccgtcg gccagccacg atagccgcg tgcctcg tgcagttcat tcagggcacc ggacaggtcg gtcttgacaa aaagaaccgg ggcgccttc gctgacagagcc ggaacacggc ggcatacgag cagccgattt tctgttgc ccagtcatag ccgaatagcc tctccaccca agcggccgg gaacctgcgt gcaatccatc ttgttcaatc caagctccca tggccctcg actagagtgc 35	1140
35	agatccgata tcgccccggc tcgactctag aggatccaag cttcaactgct taaattcaca aaaagagaaaa agtaagacca aaggaataaa tcatcctcaa accaaaaaca catcatacaa aatcatcaa cataaatctc cagatgtatg agcaccaatc cagttatatac acactcttac caccatca acagattaa cagcgaatata agcttaagcc catacaatta tccgatccaa acaaatataa tcgaaaccgg cagaggaata agcaagtga tcaaaaagta tgggacgagg 40	1200
40	aagaagatga tacctgaatg agaaagtcaa taaccttgac cgcgaatcgat ttgaagaaaa tggagaaaaat cgggtgtatg gaataaaatc ttcaatgtat gagatataatg atctctttgg tgtcagtac atggcacacg ctatcaattt agaaaaacgc ggtgggtggt caccagaatt actacttctc ggtctgattt ggtcatatcc gtattaagtc cggtaatatt tttccataac tggggtttga acattcggtt tcttttttc agttagtccg atttggagtt ttgagtatgg 45	1260
45	aaaaataata ctgaatttat ttgttcaaac tggggggaa aaaatatttc ccttaattac 1980	1320

5	gaatataatt aaaattttaa aattcatttt attagatctt gtttaattcg gtttaatgca ttaatgaatt tcggtttaag tcggtttcg gttttatgt cccaccacta tctacaaccg atgatcaacc ttatctccgt attcaccaca aacagtcatc actctactt gacacaaaaa ctctttgtc tccgtctctc tgtctctcg atccccgggt aggtcagtcc cttatgttac gtcctgtaga aaccccaacc cgtgaaatca aaaaactcga cggcctgtgg gcattcagtc tggatcgcga aaactgtgga attggtcagc gttggggaa aagcgcgtta caagaaagcc ggcaattgc tgtgccagga gtttttaacg atcaagttcg ccgatgccag atattcgtaa ttatgccggc aacgtcttgg tatcagcgcga aagtcttta ttccgaaagg ttggcaggc cagcgtatcg tgctcgctt cgatgcggc actcattacg gcaaagtgtg ggtcaataat 10 caggaagtga tggagcatca gggcggctat acgcatttg aagccgatgt cacgcccgtat gttattgccg gaaaaagtgt acgtaaatgtt ctgcctctac ctttgcataa tatataataa ttatcattaa ttagtagtaa tataatattt caaatattt tttcaaaaata aaagaatgt gtatatacgca attgcatttc tgtatgttat aagtgtgtat attttatattt ataactttc taatatacgca caaaaatttg ttgatgtgca ggtatcaccg tttgtgtgaa caacgaactg 15 aactggcaga ctatccgcg gggatgggt' attaccgacg aaaacggcaa gaaaaagcag tcctacttcc atgattttt taactatgcc ggaatccatc gcagcgtaat gctctacacc acgcccgaaca cctgggtgga cgatatcacc gtggtgcgc atgtcgcgc agactgtac cacgcgtctg ttgactggca ggtggggcc aatgggtatg tcagcggtga actgcgtgat gccccatcaac aggtgggtgc aactggacaa ggcactagcg ggactttgca agtggtaat 20 ccgcacactt ggcaaccggg tgaagggtat ctctatgaac tgcgtcgtc acggccaaagc cagacagagt gtgatatcta cccgcttcgc gtggcatcc ggtcagttggc agtgaaggc gaacagttcc tgattaacca caaaccgttc tacttactg gctttgtcg tcatgaagat gcggacttac gtggcaaagg attcgataac gtgtcgatgg tgcacgacca cgcattaaatg gactggattt gggccaaactc ctaccgtacc tcgcattacc cttacgctga agagatgctc 25 gactggcag atgaacatgg catcggtgt attgatgaaa ctgctgtgt cggctttaac ctctcttttag gcattgggtt cgaagcgggc aacaagccga aagaactgtc cagcgaagag gcagtcaacg gggaaactca gcaagcgcac ttacaggcga tttaaagagct gatagcgcgt gacaaaaacc acccaagcgt ggtgatgtgg agtattgcca acgaaccgga taccgtccg caagtgcacg ggaatatttc gccaactggcg gaagcaacgc gtaaaactcga cccgacgcgt 30 ccgatcacct gcgtaatgt aatgttctgc gacgctcaca ccgataccat cagcgatctc tttgcattgtc tgcgtcgaa ccgttattac ggatggatgt tccaaagccg cgatttggaa acggcagaga aggtactggaa aaaagaactt ctggcctggc aggagaaaact gcatcagccg attatcatca ccgaatacgg cgtggatacg tttagccggc tgcactcaat gtacaccgac atgtggatgt aagagtatca gtgtcgatgg ctggatatgt atcaccgcgt ctttgcattgtc 35 gtcagcggcg tcgtcggtga acaggtatgg aatttcgcgg attttgcac ctgcacaggc atattgcgcg ttggcggtaa caagaaaggg atcttcactc ggcacccaa accgaagtcg gcggctttc tgctgcacaa acgctggact ggcacccaa accgcacccgg ggaggcaac aatgaatcaa caacttcct ggcacccat cgtcggtac accgcacccgg attgtacccg agctcggtac ccggcgaaaa aatcaccatgt ctctctctac aatctatct 40 ctctctatcc ttctccagaa taatgtgtga gtatgtccca gataaggaa tttaggttct tatagggttt cgctcatgtc tttagcatat aagaaaaccct tagtgcgtat ttgtattgt aaaatacttc tatcaataaa atttctaatt cctaaaacca aaatccatgt accgggtacc gagctcgaaat tcactggccg tcgtttaca acgactcagc agctgcacag gaggcccgat ctagtaacat agatgacacc ggcgcgcata atttaccta gtttgcgcgca tatattttgt 45 ttctatcgc gtattaaatg tataattgcg ggactctaataat cataaaaaacc catctataa	2040 2100 2160 2220 2280 2340 2400 2460 2520 2580 2640 2700 2760 2820 2880 2940 3000 3060 3120 3180 3240 3300 3360 3420 3480 3540 3600 3660 3720 3780 3840 3900 3960 4020 4080 4140 4200 4260 4320 4380 4440 4500 4560 4620 4680
---	--	--

	ataacgtcat gcattacatg ttaattatta catgcttaac gtaattcaac agaaattata	4740
	tgataatcat cgcaagaccg gcaacaggat tcaatcttaa gaaactttat tgccaaatgt	4800
	ttgaacgatc ggggatcattc cgggtctgtg gcgggaactc cacgaaaata tccgaacgca	4860
	gcaagatcg gtcgtact cagatctggg taactggct aactggcctt ggaggagctg	4920
5	gcaactcaaa atcccttgc caaaaaccaa catcatgcca tccaccatgc ttgtatccag	4980
	ccgcgcgcaa tgtacccgc gctgtgtatc ccaaagcctc atgcaaccta acagatggat	5040
	cgttggaaag gcctataaca gcaaccacag actaaaacc ttgcgcctcc atagacttaa	5100
	gcaaatgtgt gtacaatgtt gatccttaggc ccaacctttg atgcctatgt gacacgtaaa	5160
10	cagactctc aactgtccaa tcgtaagcgt tcctagcctt ccagggccca gcgttaagcaa	5220
	taccagccac aacaccctca acctcagcaa ccaaccaagg gtatctatct tgcaacctct	5280
	ctaggtcatc aatccactct tgggtgttt gtggctctgt cctaaaggatc actgttagacg	5340
	tctcaatgtt atgggttaacg atgtcacaaa cgcggccat atcgctgtc gtagctggcc	5400
	taatctcaac tggctctc tccggagaca tgcgagatt atttggattt agagtgaata	5460
	tgagactcta attggatacc gaggggattat tggtaacgt cagtggagca tttttgacaa	5520
15	gaaatatttg cttagctgata gtgaccttag ggcactttt aacgcgcaat aatggtttct	5580
	gacgtatgtg cttagctcat taaactccag aaacccgcgg ctgagtggct cttcaacgt	5640
	tgcgttctg tcagttccaa acgtaaaacg gttgtcccg cgtcatcgcc ggggtcata	5700
	acgtgactcc cttattctc cgctcatgtat cagattgtcg ttccgcct tcagttaaa	5760
	ctatcgtgt ttgacaggat ctcgttggat aataattgtc attagattgt ttttatgcata	5820
20	agatgcactc gaaatcagcc aatttttagac aagtatcaaa cggatgttac ttcaagtacat	5880
	taaagacgtc cgcaatgtgt tattaagttt tctaagcgtc aatttgttta caccacaata	5940
	tatcctgcca ccagccagcc aacagctccc cgaccggcag ctcggcacaa aatcaccacg	6000
	cgttaccacc acgcggccg gccgcattgtt gttgaccgtt ttgcggca ttgcccagtt	6060
	cgagcgttcc ctaatcatcg accgcacccg gagcgggccc gaggcccca aggccccagg	6120
25	cgtgaagttt ggccccccgc ctaccctcac cccggcacag atcgccacg cccgcgagct	6180
	gatcgaccag gaaggccgcga ccgtaaaga ggcggctgca ctgttggcg tgcatcgctc	6240
	gaccctgtac cgccacttgc agcgcagcga ggaagtgcgc cccaccggagg ccaggccgcg	6300
	cgggtccttc cgtgaggacg cattgaccga ggccgacgccc ctggccggcc ccgagaatga	6360
	acgccaagag gaacaagcat gaaaccgcac caggacggcc aggacgaacc gtttttatt	6420
30	accgaagaga tcgaggcggaa gatgatcgcc gccccgtacg tggtcgagcc gcccgcgcac	6480
	gtctcaaccc tgcggctgca taaaatctg gcccgttgc ctgatgcctt gctggccggc	6540
	tggccggcca gcttggccgc tgaagaaacc gagcggccgc gtcataaaag gtgtatgtta	6600
	ttttagttaaa acagttgcg tcatgcggc gctgcgtata tgatgcgtat agtaataaaa	6660
	caaatacgca agggaaacgc atgaaggat tgcgttact taaccagaaa ggcgggtcag	6720
35	gcaagacgac catcgcaacc catctagccc ggcgcctgca actcgccggg gccgatgttc	6780
	tgttagtcga ttccgatccc cagggcactg cccgcattt ggcggccgtg cgggaagatc	6840
	aaccgctaac cgttgcggc atcgaccgcg cgcacgttgc cgcgcacgtg aaggccatcg	6900
	gccggccgcga cttagtgcgtt atcgacggag cggccggccgc ggcggacttgc gtcgtgtccg	6960
	cgatcaaggc agccgacttc gtgctgattc cggcgcagcc aagcccttac gacatatggg	7020
40	ccaccgcccga cttgggtggag ctgggttaacg agcgcatttga ggtcacggat ggaaggctac	7080
	aaggccgcctt tgcgtgtcg cgggcgtatca aaggcgcgcg catcgccgtt gaggttgcgc	7140
	aggcgcgtgc cgggtacggat ctggccattc ttgagtccttgc tatcgcgtat cgcgtgagct	7200
	accaggccac tgccgcgcgc ggcacaaaccg ttcttgcattc agaaccggag ggcgcacgcgt	7260
	cccgcgaggt ccaggcgcgtg ggcgtgaaa ttaaatcaaa actcatttgc gttaatgggg	7320
45	taaagagaaaa atgagcaaaa gcacaaacac gctaagtgcgc ggcgcacgcgc	7380

5	cagcaaggct gcaacgttgg ccagcctggc agacacgcca gccatgaagc gggtaactt tcagttccg gcgaggatc acaccaagct gaagatgtac gcggtacgcc aaggcaagac cattaccgag ctgctatctg aatacatcgc gcagctacca gagtaaatga gcaaatgaat aatatgatag atgaattta gcggctaaag gaggcggcat ggaaaatcaa gaacaaccag gcaccgacgc cgtgaatgc cccatgtgtg gaggaacggg cggttggcca ggcgttaagcg gctgggttgc ctgccccccc tgcaatggca ctggAACCCC caagcccgag gaatccggcgt gagccgtcgc aaaccatccg gcccgttaca aatccggcgc gcgctgggtg atgacctgtt ggagaagttg aaggccgcgc aggccgcaca gcgcaacgc atcgaggcag aagcacgc cggtgaatcg tggcaagcgg ccgctgatcg aatccgaaa gaatccggc aaccgc 95 10 15 20 25 30 35 40 45	7440 7500 7560 7620 7680 7740 7800 7860 7920 7980 8040 8100 8160 8220 8280 8340 8400 8460 8520 8580 8640 8700 8760 8820 8880 8940 9000 9060 9120 9180 9240 9300 9360 9420 9480 9540 9600 9660 9720 9780 9840 9900 9960 10020 10080
---	---	--

5	gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag gcgggtctac agagttcttg aagtgggtgc ctaactacgg ctacactaga aggacagtat ttggtatctg cgctctgctg aagccagtt cttcgaaa aagagttgg agctcttgc cccgaaaca aaccaccgct ggtagcggtg gttttttgt ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt tgatctttc tacgggtct gacgctcagt ggaacgaaaaa ctcacgttaa gggattttgg tcatgcata tatatctccc aatttgcata gggcttattta tgcacgctt aaaaataataa aagcagactt gacctgatag tttggctgtg agcaattatg tgcttagtgc atctaacgct ttagttaagc cgcgcgcga agcggcgtcg gcttgaacga atttctagct agacattatt tgccgactac cttgggtatc tggccttca cgtatggac aaattcttcc aactgatctg cgcgcgaggc caagcgatct tcttcttgc caagataagc ctgtctagct tcaagtatga cgggctgata ctggggccggc aggcgctcca ttggccagtc ggcagcgaca tccttcggcg cgattttggc ggttactgcg ctgtacccaa tgccggacaa cgtaagcact acatttcgct catcgccagc ccagtcggc ggcgagttcc atagcgttaa ggttccattt agcgcctcaa atagatcctg ttcaaggaacc ggatcaaaga gttcctccgc cgctggaccc accaaggcaa cgctatgttc tcttgccttt gtcagcaaga tagccagatc aatgtcgatc gtggctggct cgaagatacc tgcaagaatg tcattgcgt gccattctcc aaattgcagt tcgcgttag ctggataacg ccacggatg atgtcgtcg gcacaacaat ggtgacttct acagcgcgga gaatctcgct ctctccaggg gaagccgaag tttccaaaag gtcggtgate aaagctcgcc gcgttgcattc atcaaggctt acggtcaccg taaccagcaa atcaatataca ctgtgtggct tcaggccgcc atccactgcg gagccgtaca aatgtacggc cagcaacgtc ggttcgagat gcgcgtcgat gacgccaact acctctgata gttgagtcga tacttcggcg atcaccgctt ccccccattat gtttaacttt gttttagggc gactgcccctg ctgcgttaaca tcgttgcgc tccataacat caaacatcga cccacggcgt aacgcgcttg ctgcttggat gcccggaggca tagactgtac cccaaaaaaa cagtcataac aagccatgaa aaccggccact gcg	10140 10200 10260 10320 10380 10440 10500 10560 10620 10680 10740 10800 10860 10920 10980 11040 11100 11160 11220 11280 11340 11400 11460 11520 11533
---	---	---

<210> 5
 <211> 33
 <212> DNA
 30 <213> Artificial Sequence

35 <220>
 <223> Oligonucleotide primer
 <400> 5
 acggatccga gagacagaga gacggagaca aaa
 <210> 6
 40 <211> 28
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

5 <220>

<223> Oligonucleotide primer

<400> 6

gcggatccaa gcttcactgc tttaaattc

28

10

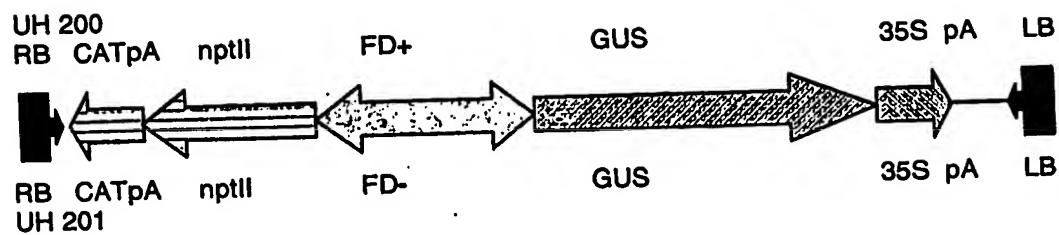


Fig. 1

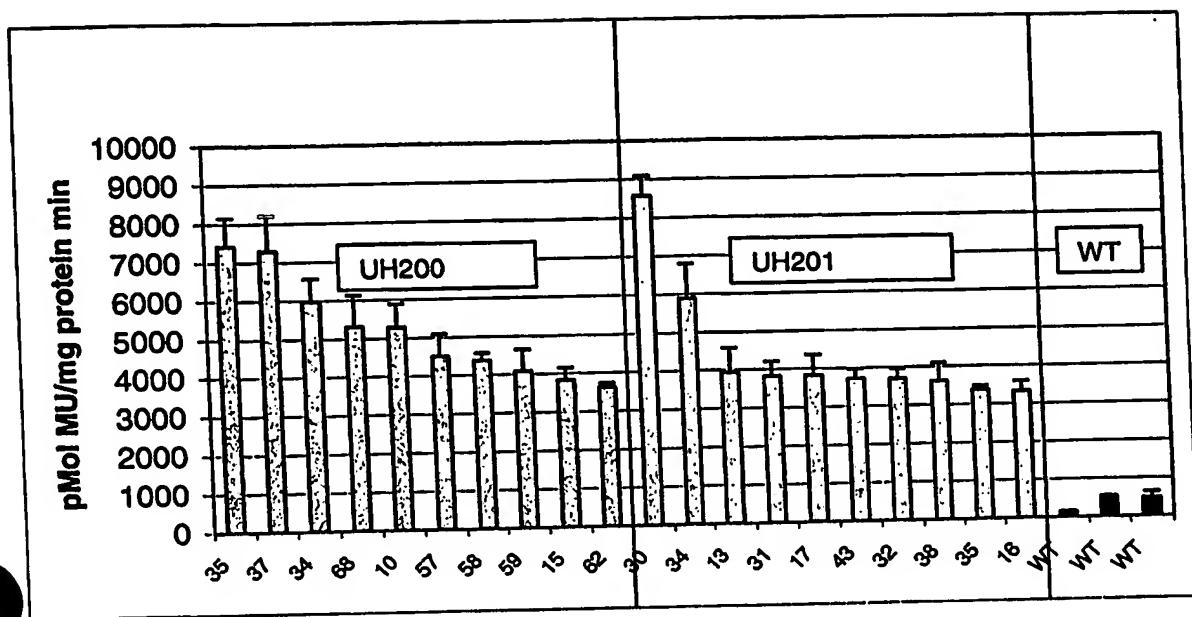


Fig. 2

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.